

Titre: Développement de stratégies d'immobilisation du facteur de croissance endothélial vasculaire : contrôle de l'activité biologique pour le génie tissulaire
Title:

Auteur: Frédéric Murschel
Author:

Date: 2017

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Murschel, F. (2017). Développement de stratégies d'immobilisation du facteur de croissance endothélial vasculaire : contrôle de l'activité biologique pour le génie tissulaire [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/2625/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/2625/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Gregory De Crescenzo, & Mario Jolicoeur
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT DE STRATÉGIES D'IMMOBILISATION DU FACTEUR DE
CROISSANCE ENDOTHÉLIAL VASCULAIRE : CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ
BIOLOGIQUE POUR LE GÉNIE TISSULAIRE

FRÉDÉRIC MURSHEL
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

JUIN 2017

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

DÉVELOPPEMENT DE STRATÉGIES D'IMMOBILISATION DU FACTEUR DE
CROISSANCE ENDOTHÉLIAL VASCULAIRE : CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ
BIOLOGIQUE POUR LE GÉNIE TISSULAIRE

présentée par : MURSCHEL Frédéric

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. HENRY Olivier, Ph. D., président

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. BANQUY Xavier, Ph. D., membre

Mme HOESLI Corinne, Ph. D., membre externe

DÉDICACE

À ma famille, de sang, de cœur, d'ici et d'ailleurs

REMERCIEMENTS

Je ne saurais faire ici une liste exhaustive des remerciements qu'il me faudrait adresser. Je tiens cependant à ce que vous sachiez tous que, même si elles ne sont pas énoncées, votre contribution et votre sympathie n'ont pas été mésestimées et ne seront pas oubliées.

À toi, lecteur. Il est dit qu'il n'y pas d'auteur sans lecteur. Je te remercie donc d'avoir ouvert ce manuscrit, et pour le temps que tu auras consacré à sa lecture.

À mon directeur, le professeur Grégory De Crescenzo. Greg, tu es une personne remarquable : attentionné et attentif, intéressant et intéressé, humain et humaniste. Et tes qualités de directeur de recherche sont à l'égal de tes qualités de personne. Superviseur bienfaisant, tu as toujours su me guider scientifiquement, te montrer très disponible et instructif lorsque je manquais d'assurance, mais aussi m'accorder beaucoup de liberté et de confiance lorsque je souhaitais m'aventurer dans l'inconnu et apprendre de mes propres erreurs. Tu as su avoir le mot juste pour m'encourager à aller de l'avant, que ce soit pour viser la lune ou pour redescendre sur terre. Tu m'as fourni une pression positive et clémente pour que j'atteigne les objectifs que nous nous sommes fixés, tout en priorisant mon épanouissement. Mes plus sincères remerciements pour tout cela, pour cette riche expérience que nous avons partagée sept années durant.

À mon codirecteur, le professeur Mario Jolicoeur. Mario, je te remercie sincèrement pour l'accueil à bras ouvert que tu m'as donné, au départ pour une maîtrise, et ton soutien pour le passage vers la thèse. Un soutien que tu n'as cessé de démontrer, notamment dans les envies que j'ai exprimées et les choix que j'ai faits, un soutien nullement altéré, malgré les changements majeurs apportés dans la direction de nos travaux et la teneur de notre collaboration. Merci donc pour ta compréhension, mais aussi pour tes conseils avisés et ton regard critique, tes analyses complémentaires qui m'ont à plus d'une reprise permis de prendre un recul judicieux sur mes travaux.

À Samantha Noël. S.A.M., je crois que tu sais déjà tout le bien que je pense de toi et à quel point je te suis reconnaissant pour ce que tu m'as apporté. Tu possèdes un génie et un cœur hors du commun. Tu es la personne vers qui je me tourne en cas de doute et à qui j'accorde ma plus grande confiance. Merci pour tous ces moments partagés, joyeux, tristes ou les deux à la fois (je

n'oublierai jamais *Karma chameleon*). Merci pour ton appui dans tous les aspects de ma vie pendant ces (bientôt) dix dernières années, durant lesquelles tu as été tour à tour une camarade appréciée, une amie chérie et une collègue respectée, et finalement une sœur de cœur.

À Charles Fortier. Keufreu, GroKarl, CFR, tu possèdes toi aussi une intelligence hors du commun, qui couvre sans doute tous les types tels que décrits par Howard Gardner, sauf peut-être l'intelligence spatiale, mais personne n'est parfait [insert smiley face]. Je t'ai vu grandir et t'émanciper depuis notre rencontre il y a déjà dix ans, et ça a été un authentique plaisir. Je te remercie d'avoir été présent à mes côtés, d'avoir été un modèle qui m'a motivé à l'excellence. Merci d'avoir été une personne sur laquelle je savais pouvoir compter, que ce soit au laboratoire ou en privé. Tu invites naturellement les personnes que tu côtoies à suivre tes pas, à « cristalliser » leurs talents, et c'est avec une grande réjouissance que j'ai marché à tes côtés, mon deuxième grand frère.

À Dârini Vedarattiname. Darwini (:F), je ne m'étendrai pas sur des éloges et serai succinct, tu sais également toute l'admiration que j'ai pour toi et à quel point notre rencontre a profondément changé ma vision du monde. Tu m'as permis d'ouvrir mon champ de compétences et de me développer en tant qu'humain, tu es rapidement devenue une amie à qui je sais pouvoir me fier et me confier. À défaut de pouvoir décrire avec justesse l'impact que tu auras eu sur cette thèse, sois assurée que ta place dans ces remerciements est amplement méritée.

À Édith, Roger et Fabien, de l'autre côté de l'Atlantique. Maman, papa, frerot, je ne crois pas nécessaire de préciser à quel point vous m'êtes chers, et à quel point votre confiance a été importante pour moi. Votre contribution à cette thèse a sans doute été discrète, mais en aucun cas modique. Vous avez tous trois toujours soutenu mes choix, et vous m'avez motivé, chacun d'une façon différente, à donner le meilleur de moi-même. Merci d'être les piliers inébranlables grâce auxquels je peux bâtir mon avenir.

À vous tous, mes amis, ma famille, mes collègues qui m'avez apporté votre soutien, qui vous êtes inquiétés pour moi lorsque le moral n'était pas là et surtout avec qui j'ai partagé les moments les plus joyeux : merci pour votre énergie – j'espère, un jour, pouvoir vous retourner la pareille. Un merci spécial à Benoît, pour tout ce que tu m'as apporté et appris. Merci à Cyril (B.) et à Yuan, pour les apprentissages essentiels du tout début. Merci à Inès, Benoît, Pauline, Sam, Nesrine et Cyril (A.), vous qui m'avez accordé votre confiance et m'avez permis de m'impliquer

dans vos projets et manuscrits. Un énorme merci à Aldo, pour ton investissement remarquable, à Charles, à Sam ainsi qu'au professeur Bob Hodges, contributeurs directs et indispensables à la réussite de mes travaux.

À Adeline, Ben, Cécile, Charles, Éric, Edwige, Florian, Kahina, Massi, Olga, Pauline et Sam : merci pour tous les excellents moments passés ensemble des années durant, des BBQ aux brunchs, du couscous aux délices d'Halloween, du chocolat belge aux M&Ms. Merci également à tous ceux que je n'ai pas encore mentionnés, anciens et nouveaux, pour le fun partagé à la paillasse, au lunch ou en dehors : Alex, Antoine, Atefeh, Audrey, Benoît, Cédric, Celestine, Cyril, Claudia, Guillaume, Gwendoline, Gwladys, Julien, July, Nesrine, Pei Lian, Péo, Xiaojie, Xinhe et Zahra.

À tous mes compères du Rotaract, enfin, un remerciement des plus sincères pour cette expérience exceptionnelle qui m'a permis d'en apprendre beaucoup sur moi-même – avec un clin d'œil particulier à Adeline, Annabel, Dârini, Jonathan, Nebi et Paulin.

RÉSUMÉ

Un effort majeur de recherche est aujourd'hui porté sur le développement de nouvelles stratégies à base de matériaux synthétiques pour réparer ou remplacer des tissus endommagés, notamment pour le traitement des maladies cardiovasculaires – première cause de mortalité à l'échelle mondiale. Le défi majeur dans ce domaine est l'établissement d'un réseau vasculaire fonctionnel pour alimenter les cellules en oxygène et nutriments et éliminer les déchets métaboliques, condition *sine qua non* d'un tissu viable. Le réseau vasculaire chez l'Homme naît en effet d'un processus hautement complexe et finement régulé, et est sans cesse remodelé : sa conception *in vitro* en est d'autant plus ardue. Parmi les nombreux effecteurs biologiques responsables de l'angiogenèse, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) apparaît comme un acteur primordial. Il est en effet le principal médiateur du comportement des cellules endothéliales – ces dernières étant au cœur du développement primaire des vaisseaux et assurant le rôle critique d'interface entre le tissu et le sang. Des études de longue haleine menées sur l'angiogenèse ont ainsi mis en évidence l'ubiquité de VEGF dans ces processus, une présence incontournable mais surtout contrôlée, en termes de concentration, de présentation et même de forme.

Afin de permettre au génie tissulaire de progresser, une hypothèse biologique a été formulée dans le cadre de cette thèse : le développement de l'angiogenèse thérapeutique requiert l'imitation des processus physiologiques pour contrôler la présentation de VEGF, en particulier vis-à-vis de sa stabilité sur le support et de sa capacité à être internalisé. La validation de cette hypothèse nécessite quant à elle une plateforme adéquate pour mener les essais, et parmi les technologies existantes, notre attention s'est portée sur les interactions superhélices, soit un système moléculaire d'attache très documenté qui comprend deux peptides complémentaires capables de s'auto-assembler. Une seconde hypothèse, d'ordre technologique cette fois, a ainsi été formulée : le système superhélice permet d'immobiliser VEGF sur un substrat solide et de contrôler sa présentation et sa stabilité. Plus précisément, un objectif a été défini quant à la gamme d'affinités à couvrir, soit entre 10^7 et 10^{11} M⁻¹.

Nous avons, dans un premier temps, validé l'emploi d'un premier système superhélice basé sur les peptides (EVSALEK)₅ et (KVSALKE)₅, ou E5 et K5, pour immobiliser VEGF. Pour ce

faire, une chimère E5-VEGF a été produite et caractérisée : son immobilisation a été confirmée par test ELISA et son activité biologique démontrée via la promotion de la survie de cellules endothéliales modèles. Ces résultats, rapportés dans le Chapitre 4, constituent notre premier manuscrit, publié dans le journal *Acta Biomaterialia*. De façon intéressante, l'immobilisation d'E5-VEGF sur des surfaces présentant le peptide complémentaire K5 a été confirmée au moyen de tests avec un biocapteur à résonance plasmonique de surface (SPR). Au cours de ces derniers, la stabilité de la protéine immobilisée est apparue très haute : aucune dissociation du complexe n'a été observée, et il n'a pas été possible de régénérer les surfaces.

La régulation que nous souhaitons mettre en place touche majoritairement à la libération contrôlée du facteur de croissance, c'est pourquoi d'autres couples de peptides formant des interactions superhélices ont été étudiés. En collaboration avec le professeur Hodges de l'Université du Colorado, trois peptides analogues du peptide K5 ont été conçus et caractérisés finement avec un biocapteur SPR. La capacité des trois nouveaux peptides à capturer E5-VEGF a été confirmée, et les substitutions de résidus – choisies pour déstabiliser le cœur hydrophobe des superhélices – ont permis de diminuer la stabilité de la protéine immobilisée. Plusieurs essais menés avec d'autres molécules porteuses d'une ou plusieurs étiquettes E5 ont permis d'identifier les couples couvrant la gamme d'affinités voulue. Ces résultats constituent le second manuscrit, présenté dans le Chapitre 5 et publié dans le journal *Biomacromolecules*.

Les essais SPR et les tests ELISA réalisés ont mené à une découverte fortuite : la protéine chimère E5-VEGF présente une propension forte à s'adsorber sur certains substrats ne présentant pas le peptide complémentaire K5. Une étude approfondie, présentée dans le Chapitre 6 et publiée dans le journal *Biomacromolecules*, a permis de déterminer les forces sous-jacentes à ce phénomène. La caractérisation et l'optimisation de cette adsorption spécifique par l'étiquette E5 a de plus rendu possible un contrôle relatif de la vitesse de la libération contrôlée, sans affecter la bioactivité du facteur de croissance (démontrée dans des essais de prolifération de cellules endothéliales). Il en ressort une nouvelle stratégie d'immobilisation de VEGF, simplifiée, accélérée et relativement stable, qui présente un fort potentiel pour de nombreuses applications en médecine régénératrice.

Les travaux présentés dans les manuscrits associés à cette thèse valident l'hypothèse technologique formulée sur les interactions superhélices. En outre, de nombreux résultats

complémentaires, réalisés en collaboration directe avec plusieurs collègues au sein du groupe de recherche, ont permis de développer une plateforme qui permet d'immobiliser E5-VEGF avec un contrôle fin, tant sur la densité surfacique que sur la spécificité du greffage par interactions superhélices (l'adsorption directe étant fortement inhibée). Ce substrat adéquat pourra être mis à profit pour étudier la réponse de cellules endothéliales à E5-VEGF immobilisé via les 4 peptides analogues – un plan d'expériences détaillé est suggéré dans le Chapitre 7 de cette thèse. Succinctement, la validation de l'hypothèse biologique nécessitera de caractériser l'internalisation de VEGF et de ses récepteurs et de l'associer à la réponse cellulaire – tant au niveau des voies de signalisation activées que vis-à-vis du comportement macroscopique (migratoire, prolifératif, etc.). En outre, les technologies développées pourront être mises à profit pour d'autres applications dans le domaine de la médecine régénératrice et du génie tissulaire, ou en combinaison avec d'autres facteurs de croissances et biomolécules, pour l'encapsulation de médicaments ou encore la thérapie génique.

ABSTRACT

In order to repair or replace damaged tissues, notably for the treatment of cardiovascular diseases – the world-leading cause of death, great effort is currently spent on the development of new strategies that are based on synthetic materials. The major challenge in that endeavour is to establish a functional vasculature that provides oxygen and nutrients to the cells while removing metabolic waste. Although this is a prerequisite to obtain a sustainable tissue, its conception *in vitro* has proven to be arduous. The human vascular network indeed expands via a highly complex and finely tuned process, after which it keeps being remodeled. Endothelial cells play a major role in this expansion: they drive blood vessel formation and ensure the integrity of the blood-tissue interface. Their behaviour being predominantly controlled by the vascular endothelial growth factor (VEGF), this growth factor stands out as the main biological effector of angiogenesis. Numerous studies of the angiogenic process have demonstrated the ubiquitous role of VEGF as well as the importance of its spatiotemporal control, be it in terms of concentration, presentation or form.

So as to foster advances in tissue engineering, we first formulated a biological hypothesis: the physiological processes that regulate VEGF presentation need to be mimicked for therapeutic angiogenesis to advance, in particular regarding the stability of immobilized VEGF and its capacity to be internalized. The validation of this hypothesis requires the development of an adequate test platform and, among existing technologies, our attention was drawn to coiled-coil interactions. The coiled-coil motif is indeed a well-documented molecular structure obtained by auto-assembly of two complementary peptides. A second hypothesis, of technological nature, was thus formulated: coiled-coil interactions enable the surface immobilization of VEGF that can be controlled in terms of presentation and stability. More precisely, an affinity range spanning from 10^7 to 10^{11} M⁻¹, was determined to be of prime interest.

To begin with, we have chosen a first coiled-coil motif based on the interaction between the two peptides (EVSALEK)₅ and (KVSALKE)₅, or E5 et K5, and confirmed that it enabled VEGF immobilization. This was achieved by producing an E5-tagged VEGF chimera (E5-VEGF) and characterizing its grafting by immunosorbent assays (ELISA). Its biological activity was also demonstrated via model endothelial cell survival assays. The results, which are presented in

Chapitre 4, were compiled into the first manuscript, published in *Acta Biomaterialia*. It is here worth noticing that E5-VEGF capture on K5-decorated surfaces was further supported using a surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor and was shown to be highly stable: there was no detectable dissociation of the complex and the surfaces could not be regenerated.

The level of stability we sought for VEGF being closer to controlled release than immutable immobilization, new coiled-coil-forming peptide couples were developed. In partnership with Prof. Hodges at University of Colorado, three peptides were designed as analogues to the peptide K5 and thoroughly characterized using an SPR-based biosensor. Their ability to capture E5-VEGF was confirmed. Moreover, the residue substitutions, which were designed to destabilize the hydrophobic core of the coiled-coil, successfully diminished the stability of immobilized VEGF. A series of assays were carried out with other biomolecules bearing one or more E5 tags, and several peptide couples were identified that enable the coverage of the desired affinity range. The results comprise the second manuscript of the thesis that is presented in Chapitre 5 and was published in *Biomacromolecules*.

The various ELISA and SPR assays led to a fortuitous discovery: the chimeric E5-VEGF protein presented a strong propensity to adsorb on certain substrates that were not decorated with the complementary K5. The driving forces of the E5-tag-mediated adsorption process were thoroughly characterized, and the biological activity of adsorbed E5-VEGF was confirmed via endothelial cell proliferation assays. Moreover, a relative control on the release rate of the growth factor was achieved. The data are presented in Chapitre 6 and were compiled in an article that was published in *Biomacromolecules*. Altogether, this study has unveiled a new immobilization strategy for VEGF that is fast, readily implemented and quite stable, thus bearing strong potential for numerous applications in regenerative medicine.

The work that was performed during the thesis validates the technological hypothesis that we formulated regarding coiled-coil interactions. Moreover, an adequate test platform for the subsequent study – featuring fine control over surface density and capture specificity of E5-VEGF – was developed through a number of complementary experiments that were carried out in partnership with several colleagues. The substrate in question will prove beneficial to investigate endothelial cell response to E5-VEGF when immobilized via K5 and its three analogues. A detailed design of experiments is suggested in Chapitre 7 so as to validate the biological hypothesis of the

thesis. Briefly, this will require a refined characterization of the internalization of VEGF and its cognate receptors, in correlation with cell response, regarding both the activation of signaling pathways and the macroscopic behaviour (migration, proliferation, etc.). Furthermore, the technological tools we here present could be utilized for a number of other applications in the tissue engineering and regenerative medicine field, be it in conjunction with other growth factors or biomolecules, for drug encapsulation or even gene therapy.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	VII
ABSTRACT	X
TABLE DES MATIÈRES	XIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIX
LISTE DES FIGURES.....	XX
LISTE DES BOÎTES	XXIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXIV
LISTE DES ANNEXES.....	XXVIII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE	4
2.1 Angiogenèse thérapeutique	4
2.1.1 Formation des vaisseaux sanguins	4
2.1.2 Biologie de VEGF.....	13
2.1.3 Signalisation de VEGF.....	19
2.2 Approches technologiques pour la présentation de VEGF et leurs implications.....	31
2.2.1 Applications biomédicales de VEGF	31
2.2.2 L'immobilisation de VEGF pour l'angiogenèse thérapeutique	41
2.2.3 Endocytose et signalisation de VEGF.....	52
2.3 Les interactions superhélices.....	58
2.3.1 Généralités.....	58
2.3.2 Conception rationnelle : principes fondamentaux.....	60

2.3.3	Leviers de contrôle	62
2.3.4	Applications	66
CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL		69
3.1	Description	69
3.2	Objectifs	70
3.3	Organisation du document	71
CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : COILED-COIL-MEDIATED GRAFTING OF BIOACTIVE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR		73
4.1	Résumé	73
4.2	Header	74
4.3	Author Affiliations	74
4.4	Abstract	74
4.5	Keywords	75
4.6	Introduction	75
4.7	Methods	77
4.7.1	Chemicals and reagents	77
4.7.2	Cell culture	78
4.7.3	Plasmid	78
4.7.4	E5-VEGF production and purification	79
4.7.5	SDS-PAGE and Western Blot analyses	79
4.7.6	Surface Plasmon Resonance-based assays	79
4.7.7	E5-VEGF immobilization on aminated glass surfaces	80
4.7.8	Immobilized E5-VEGF quantification	80
4.7.9	Bioactivity assays	81
4.7.10	Data treatment	82

4.8	Results	82
4.8.1	Motivation of the work.....	82
4.8.2	E5-VEGF production and purification.....	83
4.8.3	E5-VEGF binding to its receptor ectodomains assessed in Surface Plasmon Resonance (SPR)-based assays	84
4.8.4	Concentration-dependence of soluble E5-VEGF bioactivity in serum-free conditions	86
4.8.5	E5-VEGF capture on surfaces decorated with K5 peptides assessed in SPR experiments	88
4.9	Tethered E5-VEGF bioactivity in serum-free conditions	89
4.10	Discussion	90
4.11	Conclusions	92
4.12	Notes.....	92
4.13	Acknowledgments	92
4.14	References	92
CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : TWO COMPLEMENTARY APPROACHES FOR THE CONTROLLED RELEASE OF BIOMOLECULES IMMOBILIZED VIA COILED-COIL INTERACTIONS: PEPTIDE CORE MUTATIONS AND MULTIVALENT PRESENTATION		
5.1	Résumé	99
5.2	Header	100
5.3	Author Affiliations	100
5.4	Abstract	100
5.5	Keywords	101
5.6	Introduction	101
5.7	Materials.....	104

5.8	Methods.....	105
5.8.1	Peptide synthesis, purification and characterization	105
5.8.2	Protein synthesis, purification and characterization.....	106
5.8.3	Nanoparticle preparation, purification and characterization	106
5.8.4	SPR-based assays	108
5.8.5	Protein capture and release assessed by ELISA.....	109
5.9	Results and discussion.....	110
5.9.1	Rationale for peptide design.....	110
5.9.2	Rationale for coiled-coil characterization	112
5.9.3	L/A substitutions uncover a complex mode of interaction	114
5.9.4	L/A substitutions hinder the stability of the coiled-coil complex in a position-dependent manner	116
5.9.5	The presentation of E5 impacts the sensitivity to L/A substitutions.....	118
5.9.6	The number of E5 moieties impacts the stability of the coiled-coil complex.....	119
5.9.7	The experimental conditions impact the apparent stability of the coiled-coil complex	122
5.10	Conclusion.....	125
5.11	Supporting information available.....	126
5.12	Acknowledgements	126
5.13	References	127
CHAPITRE 6	ARTICLE 3 : SPECIFIC ADSORPTION VIA PEPTIDE TAGS: ORIENTED GRAFTING AND RELEASE OF GROWTH FACTORS FOR TISSUE ENGINEERING	132
6.1	Résumé.....	132
6.2	Header	133
6.3	Author affiliations	133

6.4	Abstract	133
6.5	Keywords	134
6.6	Introduction	134
6.7	Materials.....	136
6.8	Methods.....	137
6.8.1	Surface amination.....	137
6.8.2	Surface characterization	137
6.8.3	Growth factor capture and quantification.....	137
6.8.4	Growth factor displacement	138
6.8.5	Cell culture and protein activity assays.....	138
6.8.6	Fluorescence microscopy	139
6.8.7	Data treatment	139
6.9	Results and discussion.....	139
6.9.1	Adsorption of coil-tagged growth factors onto polystyrene-based plates: contribution of electrostatic interactions.....	139
6.9.2	Displacement of adsorbed coil-tagged growth factors by salt and proteins: contribution of electrostatic and hydrophobic interactions.....	143
6.9.3	Tag adsorption compatibility with coiled-coil interactions.....	146
6.9.4	GF release in cell culture conditions	146
6.9.5	Endothelial cell proliferation triggered by adsorbed E5-VEGF.....	149
6.10	Conclusion.....	154
6.11	Supporting information available.....	155
6.12	Notes.....	155
6.13	Acknowledgments.....	155
6.14	References	155

CHAPITRE 7	DISCUSSION GÉNÉRALE	160
7.1	Objectif 1 : production et caractérisation d'E5-VEGF.....	160
7.1.1	Sous-objectif <i>i</i> : production d'E5-VEGF	160
7.1.2	Sous-objectif <i>ii</i> : activité biologique d'E5-VEGF en solution	161
7.1.3	Sous-objectif <i>iii</i> : activité biologique d'E5-VEGF immobilisé.....	164
7.2	Objectif 2 : modulation de la stabilité d'E5-VEGF.....	164
7.2.1	Sous-objectif <i>iv</i> : conception et production de variants du K5	164
7.2.2	Sous-objectif <i>v</i> : activité des variants du K5	164
7.2.3	Sous-objectif <i>vi</i> : atteinte de la gamme d'affinités visée.....	165
7.3	Objectif 3 : contrôle de la réponse cellulaire en réponse à E5-VEGF immobilisé	167
7.3.1	Sous-objectifs <i>vii</i> et <i>viii</i> : conception et optimisation du substrat	167
7.3.2	Sous-objectif <i>ix</i> : étude du comportement cellulaire	171
CHAPITRE 8	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	177
BIBLIOGRAPHIE	180
ANNEXES	219

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Applications biomédicales et stratégies de présentation de VEGF.	37
Tableau 2-2 : Stratégies de greffage de VEGF à la surface de biomatériaux pour l'angiogenèse thérapeutique.	49
Table 5-1 : Peptide sequences, nomenclature and physical parameters.....	112
Table 5-2 : Kinetic and thermodynamic constants related to the global fit of the interactions of the different E5/K coiled-coil pairs when using a conformational change model.	117
Table 5-3 : Thermodynamic constants related to the global fit of interactions of E5-tagged EGF and VEGF with the different K peptides when using a conformational change model.	119
Table 6-1 : Protein and peptide physical parameters.	141
Table 6-2 : Effect of the surface chemistry of polystyrene-based 96-well plates on the adsorption specificity of native and coil-tagged growth factors.	141
Table annexe -1 : Atomic percentages derived from XPS analysis of samples from PS, CB and CB-PAAm well-plates.	229

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 : Causes de mortalité à l'échelle mondiale.	2
Figure 2-1 : Composition murale des vaisseaux sanguins et lymphatiques.	5
Figure 2-2 : Mécanismes cellulaires de l'angiogenèse bourgeonnante.	7
Figure 2-3 : Structure cristalline de VEGF ₁₁₀	13
Figure 2-4 : Épissage alternatif de VEGF-A.	15
Figure 2-5 : Voies de signalisation des récepteurs (A) VEGF-R1 et (B) VEGF-R2.	21
Figure 2-6 : Athérosclérose et déploiement d'endoprothèse.	32
Figure 2-7 : Mécanismes d'action des facteurs de croissance.	42
Figure 2-8 : Représentation schématique d'un facteur de croissance immobilisé et du stress environnemental.	47
Figure 2-9 : Constantes de dissociation des interactions entre VEGF et ses partenaires biologiques, et des superhélices dimères rapportées dans la littérature.	53
Figure 2-10 : Hélice α et superhélice dimère.	59
Figure 4-1 : Graphical abstract.	75
Figure 4-2 : E5-VEGF production and purification.	84
Figure 4-3 : SPR biosensor-based assay: E5-VEGF injections over immobilized hVEGF ₁₆₅ receptor ectodomains, Flt-1-Fc and KDR-Fc.	85
Figure 4-4 : Morphological analysis of HUVE cell survival in E5-VEGF-supplemented serum-free medium.	86
Figure 4-5 : HUVE cells metabolic activity measurements and cell counting, after 48 h in E5- VEGF-supplemented serum-free medium.	87
Figure 4-6 : SPR biosensor-based assay: E5-VEGF injections over immobilized K5.	88
Figure 4-7 : HUVE cell survival on functionalized glass substrates, after 48 h in serum-free medium.	90
Figure 5-1 : Graphical abstract.	101

Figure 5-2 : Immobilization (A) and controlled release (B-C) strategies using coiled-coil interactions.	104
Figure 5-3 : Global analysis of the interaction of E5 with the K peptides.	115
Figure 5-4 : Global analysis of E5-tagged VEGF interaction with the K peptides.	120
Figure 5-5 : Interaction of E5-decorated nanoparticles with the K5 peptide.	123
Figure 5-6 : Release of E5-tagged RFP and VEGF on 96-well microplates functionalized with K peptides.	125
Figure 6-1 : Graphical abstract.	134
Figure 6-2 : Adsorption of native and tagged proteins over (A) pristine and (B) PAAm-modified polystyrene, (C) pristine and (D) PAAm-modified CellBIND, (E) Costar High-Binding, and (F) PureCoat microplates (namely, PS, PS-PAAm, CB, CB.-PAAm, CostarHB, and PureCoat), as monitored by ELISA.	142
Figure 6-3 : Sodium chloride and protein solutions trigger K5-EGF and E5-VEGF release.	144
Figure 6-4 : Coil-tag-mediated adsorption is compatible with coiled-coil-mediated recruitment of a secondary recruitment.	147
Figure 6-5 : FBS concentration mediates the release of adsorbed growth factors over time.	148
Figure 6-6 : E5-VEGF adsorbed on aminated microplates and PET films retains bioactivity. ...	150
Figure 6-7 : E5-VEGF adsorbed on PET – PAAm films promotes HUVEC proliferation.	152
Figure 7-1 : Rendements des étapes de purification d'E5-VEGF mesurés par ELISA.	161
Figure 7-2 : Influence de la concentration de sérum sur la stimulation cellulaire par E5-VEGF.	162
Figure 7-3 : Capture d'E5-VEGF sur du verre aminé mesurée par ELISA direct.	163
Figure 7-4 : Constantes de dissociation des interactions entre VEGF et ses partenaires biologiques, et résultats obtenus par biocapteur SPR.	166
Figure 7-5 : Capture d'E5-VEGF sur des surfaces de dextrane fonctionnalisées.	168
Figure 7-6 : Influence de la concentration de TCEP sur le greffage du peptide K5.	169

Figure 7-7 : Influence de l'incubation de sérum a posteriori sur l'adsorption de K5.	171
Figure 7-8 : Test ELISA « en sandwich » pour quantification d'E5-VEGF internalisé.	174
Figure 8-1 : Représentation schématique d'un hydrogel à base d'interactions superhélices.	179
Figure annexe -1 : Global analysis of the E5 interaction with the K peptides.	220
Figure annexe -2 : Global analysis of the E5-tagged EGF interaction with the K peptides.	221
Figure annexe -3 : Interaction of E5-tagged VEGF with the K5 peptide.	222
Figure annexe -4 : Global analysis of E5-tagged VEGF interaction with the K peptides.	223
Figure annexe -5 : DLS measurements of CMD/PEI polyelectrolyte complexes (PECs) bearing varying E5 surface densities (Low, Medium and High).	224
Figure annexe -6 : Interaction of E5-decorated nanoparticles with the K5 peptide.	225
Figure annexe -7 : Capture of E5-VEGF on well plates decorated with the K peptides.	226
Figure annexe -8 : XPS spectra obtained from high-resolution scans of polystyrene (PS), CellBIND (CB), and CellBIND-PAAm (CB-PAAm) well-plates.	228
Figure annexe -9 : Presence of a coil-tag enables E5-VEGF adsorption on PET-PAAm films. .	230
Figure annexe -10 : E5-VEGF adsorbed on CB-PAAm retains bioactivity.	231

LISTE DES BOÎTES

Boîte 2-1 : Formation des vaisseaux sanguins : message à retenir	12
Boîte 2-2 : Biologie de VEGF : message à retenir	18
Boîte 2-3 : Signalisation de VEGF : message à retenir	30
Boîte 2-4 : Applications biomédicales de VEGF : message à retenir	40
Boîte 2-5 : Approches technologiques pour la présentation de VEGF et leurs implications : message à retenir	57
Boîte 2-6 : Interactions superhélices : message à retenir	68
Boîte 7-1 : Discussion générale : message à retenir	176

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

(RP-)HPLC	<i>(Reversed-phase) high-performance liquid chromatography</i> , chromatographie en phase liquide à haute performance (en phase inverse)
¹ H-NMR	<i>Proton nuclear magnetic resonance</i> , résonance magnétique nucléaire du proton
ADN/ARN	Acide désoxyribonucléique/acide ribonucléique
Aha	Azidohomoalanine, acide aminé non naturel
ANG	Angiopoïétine
AUC	<i>Area under curve</i> , aire sous la courbe
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albumine de sérum bovin
CB	CellBIND®, traitement de surface sur polystyrène
CBB	<i>Casein-based blocking buffer</i> , tampon de blocage à base de caséine
CD	<i>Circular dichroism</i> , dichroïsme circulaire
CMD	<i>Carboxymethylated dextran</i> , dextrane carboxyméthylé
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole, marqueur fluorescent de l'ADN
DCM	Dichlorométhane
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> , diffusion dynamique de la lumière
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
(D)VS	(Di)vinylsulfone
E5/Ecoil	Peptide (EVSALEK) ₅
EBM/EGM	<i>Endothelial basal/growth medium</i> , milieu de culture basal/complet pour cellules endothéliales
E(P)C	<i>Endothelial (progenitor) cell</i> , cellule endothéliale (progénitrice)
EC50	<i>Half-maximally effective concentration</i> , concentration effective médiane

ECM	<i>Extracellular matrix</i> , matrice extracellulaire
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , acide éthylène-diamine-tétraacétique
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , dosage immuno-enzymatique sur support solide
Eph	Éphrine
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> , protéine kinase des points focaux d'adhésion
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , sérum fœtal bovin
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , isothiocyanate de fluorescéine
FN	Fibronectine
GF	<i>Growth factor</i> , facteur de croissance
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> , facteur de croissance épidermique
EGF-R	Récepteur à EGF
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> , facteur de croissance des fibroblastes
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> , facteur de croissance des hépatocytes
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> , facteur de croissance dérivé des plaquettes
PlGF	<i>Placental growth factor</i> , facteur de croissance placentaire
TGF	<i>Transforming growth factor</i> , facteur de croissance transformant
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , facteur de croissance endothélial vasculaire
VEGF-R1 (Flt-1)	Récepteur à VEGF 1 (<i>Fms-like tyrosine kinase 1</i>)
VEGF-R2 (KDR)	Récepteur à VEGF 2 (<i>Kinase insert domain receptor</i>)
HBS	<i>HEPES buffered saline</i> , tampon HEPES isotonique
HEK	<i>Human embryonic kidney cell</i> , famille de lignées cellulaires mammaliennes utilisées en biotechnologie pour la production de protéines recombinantes
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HIF	<i>Hypoxia-induced factor</i> , facteur induit par l'hypoxie

hpt	Heure post transfection
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , peroxydase de raifort
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycan</i> , protéoglycane héparan-sulfate
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i> , lignée de cellules endothéliales vasculaires ombilicales humaines
IMAC	<i>Immobilized metal affinity chromatography</i> , chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés
K5/Kcoil	Peptide (KVSALKE) ₅
LC-SPDP	<i>Long-chain succinimidyl 6-(3-(2-pyridyldithio)propionamido)hexanoate</i>
MA	<i>Metabolic activity</i> , activité métabolique
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i> , protéine activée par le mitogène
MES	Acide 2-(N-morpholino)-éthane-sulfonique
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> , métalloprotéase matricielle
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i> , cellule souche mésenchymateuse
NHS/EDC	N-hydroxysuccinimide/1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
NO/eNOS	<i>Nitric oxide/endothelial NO synthase</i> , oxyde nitrique/synthase endothéliale de NO
NP	Nanoparticule
PAAm	Poly(allylamine)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampon phosphate isotonique
PDEA	2-(2-pyridinyldithio)ethaneamine
PEC	<i>Polyelectrolyte complex</i> , complexe de polyélectrolytes
PEI	Poly(éthylène imine)
PET	Poly(éthylène téréphtalate)
PHD	<i>Prolyl hydroxylase</i>
PS	Polystyrène

PTFE	Poly(tétrafluoroéthylène)
PTP	<i>Phosphotyrosine phosphatase</i> , protéine phosphatase de phosphotyrosine
PU	Polyuréthane
RFP	<i>Red fluorescent protein</i> , protéine fluorescente rouge
RT-PCR	<i>Reverse-transcriptase polymer chain reaction</i> , réaction en chaîne par polymérase associée à une transcription inverse
RU	<i>Resonance unit</i> , unité de résonance (réponse d'un biocapteur optique par SPR)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> , électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> , chromatographie d'exclusion stérique.
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> , microscopie électronique à balayage
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> , résonance des plasmons de surface
TCEP	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine, agent réducteur
TERM	<i>Tissue engineering and regenerative medicine</i> , génie tissulaire et médecine régénératrice
TFA	Acide trifluoroacétique
TNBS	Acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique
VE-cadhérine	<i>Vascular endothelial cadherin</i> , cadhérine endothéliale vasculaire
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cell</i> , cellule musculaire lisse vasculaire
WST	<i>Water-soluble tetrazolium</i> , sel de tétrazolium soluble dans l'eau
XPS	<i>X-ray photoelectron spectrometry</i> , spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X

LISTE DES ANNEXES

Annexe A – Données supplémentaires du Chapitre 5	219
Annexe B – Données supplémentaires du Chapitre 6	227

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Bien qu'il soit aujourd'hui bien établi, le génie biomédical n'a émergé comme un domaine à part entière que récemment. Par sa position interdisciplinaire, entre génie et médecine, il repose sur « l'étude, la modification et le contrôle des systèmes biologiques, ainsi que sur la conception et la fabrication de produits pour la surveillance des fonctions physiologiques et pour l'assistance au diagnostic et au traitement de patients » (École Polytechnique de Montréal, 2017). Le génie biomédical est ainsi devenu le principal allié de la médecine moderne pour aider les malades et endiguer les décès prématurés.

En 2015, le monde a vu disparaître plus de 56 millions de personnes, toutes causes confondues : maladies transmissibles, non transmissibles et blessures diverses. Les maladies non transmissibles rassemblent 70% des décès avec, parmi elles, les maladies cardiovasculaires en tête de file (**Figure 1-1.A-B**). Elles devraient de plus le rester au moins jusqu'en 2030 selon les prévisions de l'Organisation mondiale de la Santé. On notera que les ischémies cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux représentent à eux seuls plus du quart des décès à l'échelle mondiale, soit 15 millions de victimes en 2015 (**Figure 1-1.C**) (Organisation mondiale de la Santé, 2016).

Pour la grande majorité des maladies non transmissibles et d'autres causes de décès, le remplacement de l'organe défaillant, ou tout du moins de sa fonction, pourrait être une solution valide et pérenne. Le problème réside réellement dans l'acquisition d'un remplacement approprié, notamment car le don d'organes demeure largement inférieur aux besoins. En 2015, bien que 2 600 transplantations aient été réalisées au Canada, plus de 4 600 patients demeuraient en attente et 242 sont décédés par manque d'un don compatible (Institut canadien d'information sur la santé, 2016). Un grand espoir est ainsi placé sur les domaines du **génie tissulaire** et de la **médecine régénératrice** qui visent à générer artificiellement les organes nécessaires au traitement des nombreux patients. Les efforts de recherche sont répartis en trois voies majeures : la génération de tissu *in vitro* pour remplacer l'organe défaillant, la régénération *in situ* de l'organe en stimulant les capacités latentes du corps humain, et leur combinaison, soit la genèse partielle d'un tissu *ex vivo* qui sera achevée après implantation.

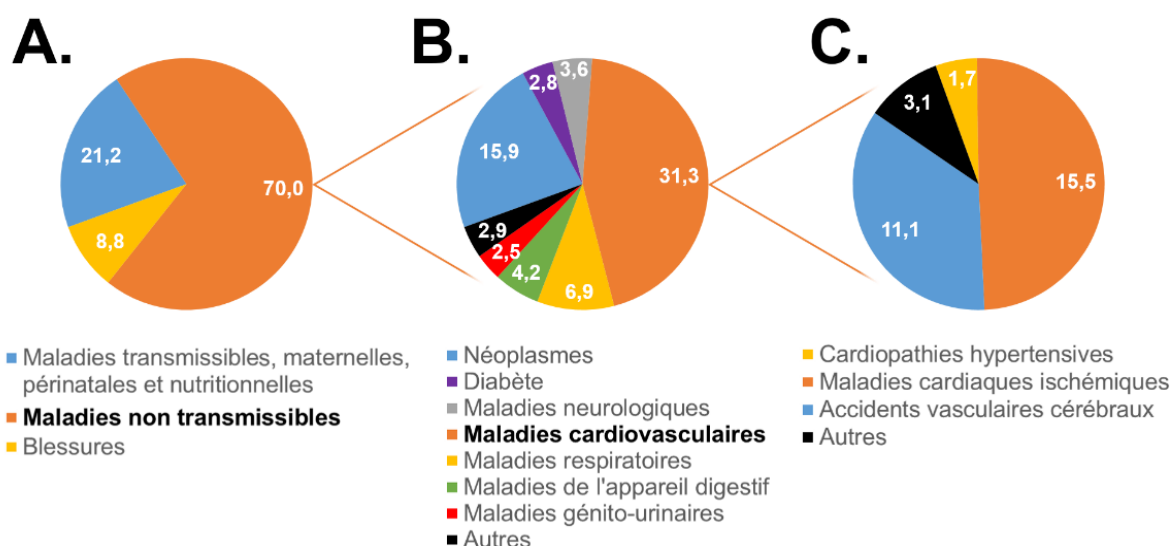


Figure 1-1 : Causes de mortalité à l'échelle mondiale.

Pourcentages estimés des causes de décès par rapport à l'ensemble des décès en 2015 : (A) l'ensemble des causes, (B) les maladies non transmissibles et (C) les maladies cardiovasculaires.

Données tirées du rapport de l'OMS (Organisation mondiale de la Santé, 2016).

La concrétisation de ces stratégies nécessite le développement de **structures** qui servent de support aux **cellules** et leur procurent un **microenvironnement** adéquat pour qu'elles réalisent leur fonction. Les applications cliniques demeurent à ce jour limitées, notamment du fait d'un accès restreint à des cellules fonctionnelles et d'un manque de matériaux aux propriétés biologiques, chimiques et mécaniques appropriées. Néanmoins, par la convergence des connaissances en biologie, science des matériaux, chimie et ingénierie, des avancées considérables ont pu être menées durant les dix dernières années. Un des défis majeurs restants réside dans **l'établissement stable de vaisseaux sanguins au sein des structures** pour permettre l'apport en nutriments et oxygène, une étape nécessaire à la survie et au bon développement des cellules qui y sont incorporées (Khademhosseini & Langer, 2016).

Cette thèse s'inscrit dans l'objectif général de remédier à cette limitation du génie tissulaire par manque de vascularisation. Le Chapitre 2 présente la revue de littérature et le cheminement mental qui ont mené à l'hypothèse de recherche et à la démarche présentées dans le Chapitre 3 :

- Avantageusement, les mécanismes cellulaires et moléculaires de la formation naturelle du système vasculaire ont été largement dévoilés après des dizaines d'années de recherche fondamentale. La section 2.1 met en évidence que le microenvironnement cellulaire et tout particulièrement la présence du **facteur de croissance endothélial vasculaire** (VEGF) sont les régulateurs primordiaux de la formation des vaisseaux sanguins. La biologie du facteur de croissance endothélial vasculaire est cependant très complexe, puisqu'il peut induire de nombreuses réponses cellulaires selon le contexte : survie, prolifération, migration, perméabilité vasculaire.
- L'incorporation de VEGF dans les matrices pour le génie tissulaire émerge ainsi comme une stratégie vraisemblablement efficace ; un nombre important d'études, présentées à la section 2.2, rapportent son emploi efficace pour stimuler l'activité cellulaire. Néanmoins, la disparité des stratégies de présentation et des techniques d'analyse employées soulève la question de notre capacité à **contrôler et à nuancer la réponse cellulaire**. Nous présentons ainsi par la suite notre réflexion sur les **implications du mode de présentation de VEGF** quant à son activité biologique, tout particulièrement lorsqu'il est immobilisé sur un support solide. Parmi les paramètres-clefs apparents, la **stabilité du facteur de croissance** pourrait être un levier majeur de contrôle. La capacité des cellules à **internaliser VEGF** pourrait en effet grandement influencer la durée et l'amplitude de la stimulation, voire la voie de signalisation activée.
- Afin de répondre à cette question fondamentale, une stratégie de greffage qui permet de contrôler la stabilité de VEGF immobilisé est nécessaire. Les **interactions superhélices**, présentées à la section 2.3, sont une des structures naturelles des protéines les plus étudiées. La profusion de données générées au cours des soixante dernières années a permis de concevoir *de novo* des superhélices dont les propriétés sont maîtrisées. Par conséquent, elles ont été mises à profit pour de nombreuses applications biotechnologiques, y compris la capture de protéines sur des substrats solides. Dans cette thèse, la polyvalence de ces interactions a été exploitée pour former un **bras de liaison spécifique et modulable** entre le support et VEGF, dans l'optique d'immobiliser le facteur de croissance et de contrôler sa stabilité.

CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 Angiogenèse thérapeutique

2.1.1 Formation des vaisseaux sanguins

2.1.1.1 Vasculogenèse, angiogenèse et lymphangiogenèse

Le système vasculaire est l'un des premiers à être développé dans l'embryon et consiste en une structure tridimensionnelle complexe qui transporte des nutriments, des cellules, des gaz et des fluides par diffusion et convection dans l'entièreté du corps. Hormis une **monocouche luminale de cellules endothéliales (EC)**, la composition murale des vaisseaux varie selon les besoins des tissus et le stade du développement (**Figure 2-1**).

Le système lymphatique fait partie intégrante du réseau vasculaire et joue un rôle crucial dans la maintenance de l'homéostasie par la collection de cellules, fluides et molécules extravasées par le sang. Les vaisseaux lymphatiques apparaissent dans l'embryon par dérivation des jeunes veines et sont similairement couverts de cellules endothéliales. Les facteurs moléculaires clés permettant leur développement n'ont toujours pas été élucidés, cependant un membre de la famille du facteur de croissance endothélial vasculaire, VEGF-C (voir section 132.1.2.1), est présenté comme un inducteur puissant de la **lymphangiogenèse** (Jain, 2003).

La **vasculogenèse** est la première étape pour la formation d'un système vasculaire stable : en premier lieu un réseau primaire se développe *ex nihilo* via le recrutement, la différenciation, la migration et enfin la coalescence de **cellules souches endothéliales** (cellules angioblastes et cellules endothéliales progénitrices intermédiaires, EPC) (Risau, 1997). Dans un second temps, c'est principalement au moyen de l'angiogenèse par bourgeonnement, ou *sprouting*, et de l'angiogenèse par intussusception, ou invagination, que le plexus primaire s'étend (Gerhardt et al., 2003). Cependant, la vasculogenèse a été rapportée chez des adultes (Adams & Alitalo, 2007) et l'élagage sélectif de vaisseaux établis a également été présenté comme un outil de remodelage vasculaire.

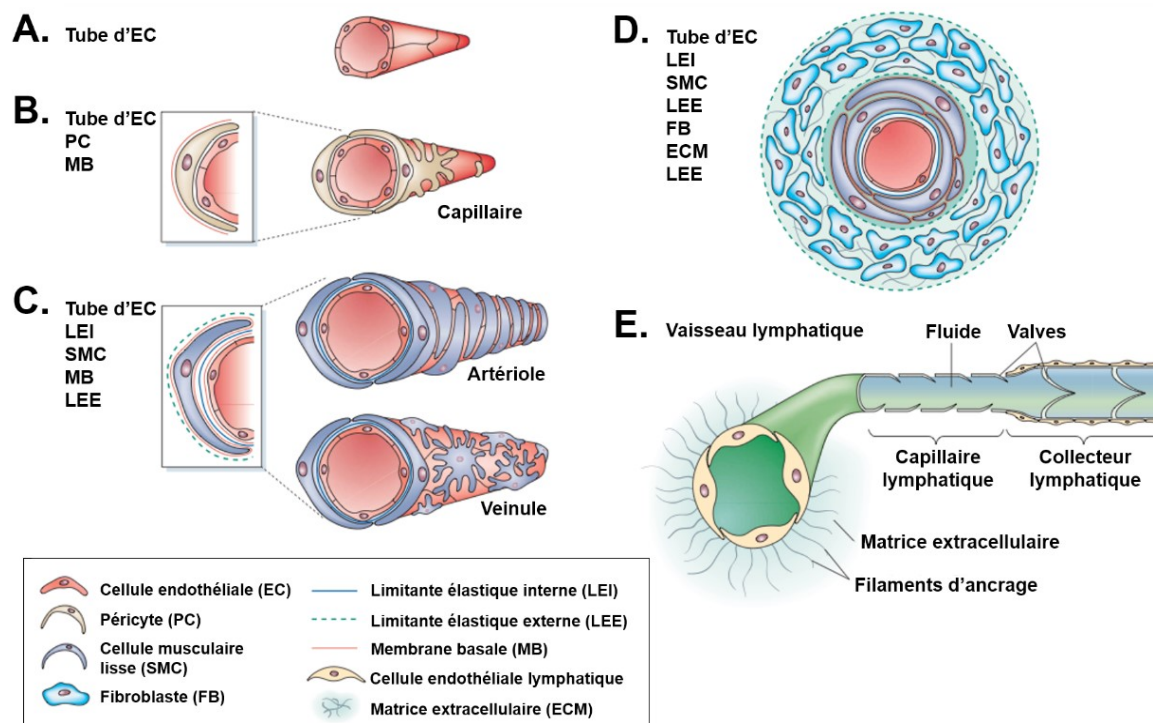


Figure 2-1 : Composition murale des vaisseaux sanguins et lymphatiques.

(A) Vaisseau embryonnaire, (B) capillaire, (C) artériole/veinule, (D) vaisseau sanguin mature et (E) vaisseau lymphatique mature. Figure adaptée avec permission de *Nature Publishing Group* et *Macmillan Publishers Ltd* (Jain, 2003).

L'**angiogenèse par intussusception** présente une grande importance biologique, mais demeure relativement mystérieuse : elle implique en effet des événements intravasculaires, ce qui explique la difficulté d'observation et d'étude. Dans un vaisseau établi, elle est amorcée par la formation d'un pilier de cellules endothéliales orthogonal au flux sanguin. L'expansion du pilier et/ou le rassemblement de plusieurs piliers permettent alors le fractionnement du vaisseau (Gianni-Barrera, Bartolomeo, Vollmar, Djonov, & Banfi, 2014; Mentzer & Konerding, 2014). Ce mécanisme, fortement contrôlé par le débit sanguin, permet le remodelage du système vasculaire : ajustement d'angle à une bifurcation, duplication des vaisseaux et élagage. Contrairement à l'angiogenèse bourgeonnante (voir section 2.1.1.2 ci-dessous), l'angiogenèse par intussusception ne nécessite pas, ou de manière très limitée, la prolifération de cellules endothéliales et la dégradation de la membrane basale (Mentzer & Konerding, 2014). Bien qu'apparemment

facultatifs, la présence de facteurs de croissance tel que le facteur de croissance endothélial vasculaire, VEGF, pourrait stimuler le processus (Gianni-Barrera et al., 2014).

À l’opposé, les mécanismes de l’**angiogenèse bourgeonnante** ont été largement décrits durant les deux dernières décennies. Ce processus apparaît comme l’agent principal de la morphogenèse et du remodelage des vaisseaux sanguins. De nombreuses études *in vitro*, corroborées *in vivo* via la manipulation génétique de vertébrés modèles (souris et poissons zèbres) (Herbert & Stainier, 2011) ont révélé une myriade de signaux intra- et extracellulaires, des échanges intercellulaires et des interactions matricielles contrôlés spatialement et temporellement. Nous nous intéresserons par la suite particulièrement à l’angiogenèse bourgeonnante, étant donné sa prédominance – que ce soit dans l’embryon ou chez l’adulte dans des conditions pathologiques et durant la réparation tissulaire et la cicatrisation (Adams & Alitalo, 2007; Gerhardt et al., 2003; Herbert & Stainier, 2011; Koch & Claesson-Welsh, 2012; Risau, 1997).

2.1.1.2 Mécanismes cellulaires de l’angiogenèse bourgeonnante

Activation : de la quiescence au bourgeonnement

La surface luminale du jeune système vasculaire est composée de cellules endothéliales étroitement connectées et dormantes, ou quiescentes (**Figure 2-2.A**). L’apparition de signaux pro-angiogéniques active le bourgeonnement en provoquant le détachement de cellules à la surface externe du vaisseau (péricytes et cellules musculaires lisses vasculaires, VSMC, **Figure 2-2.B,D**). La matrice extracellulaire subit simultanément une dégradation locale, tandis que les jonctions entre cellules endothéliales sont affectées. Certaines de ces dernières, dites **cellules endothéliales de la tête apicale, ou EC tips**, se retrouvent alors exposées à l’environnement périvasculaire (**Figure 2-2.B**) (Herbert & Stainier, 2011). Les EC tips des bourgeons vasculaires emploient de nombreuses protrusions cytoplasmiques, ou **filopodes**, qui leur permettent d’explorer le milieu environnant. Elles sont particulièrement sensibles à la distribution extracellulaire du facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGF-A, voir section 2.1.2.1) (Gerhardt et al., 2003). La perméabilité accrue des vaisseaux provoque au même moment l’extravasation de protéines plasmatiques, ce qui génère une matrice extracellulaire provisoire (Carmeliet & Jain, 2011; Jain, 2003).

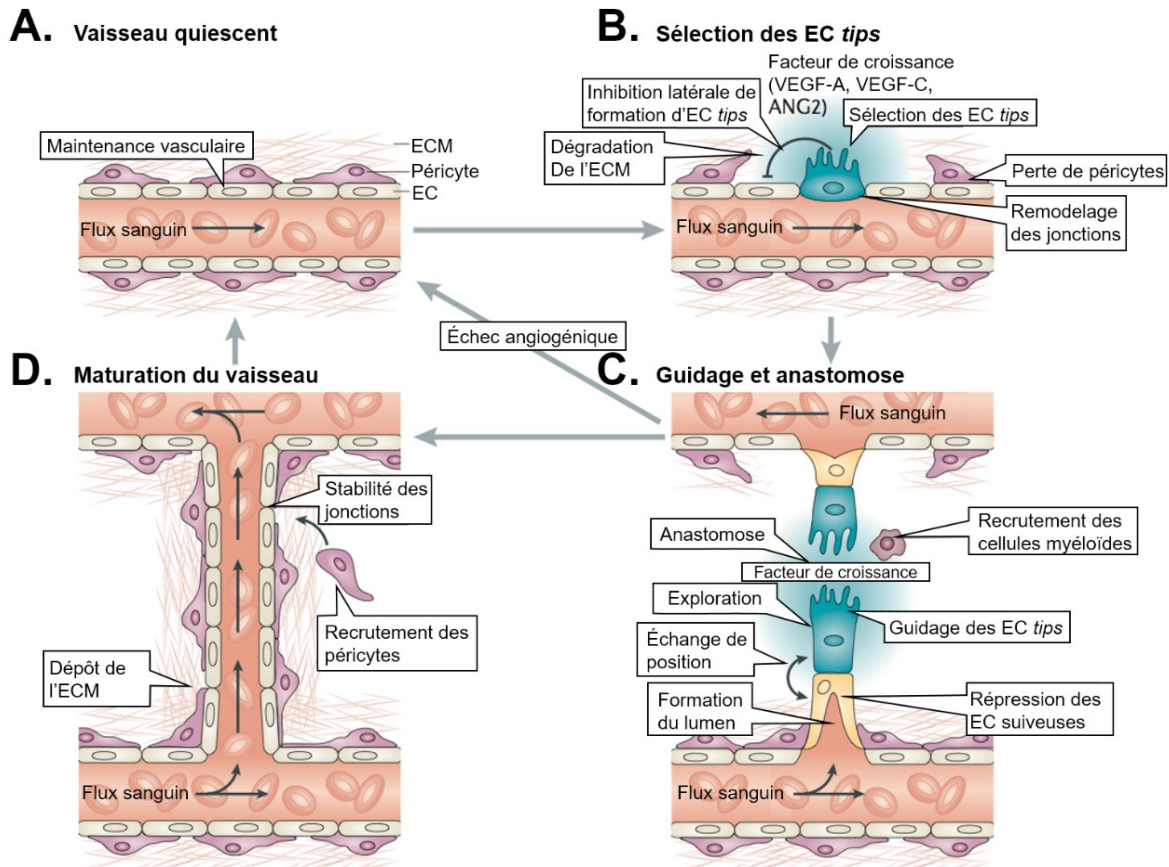


Figure 2-2 : Mécanismes cellulaires de l'angiogenèse bourgeonnante.

(A) Vaisseau quiescent, (B) sélection des EC *tips*, (C) anastomose et (D) maturation du vaisseau. Figure adaptée avec permission de *Nature Publishing Group* et *Macmillan Publishers Ltd* (Herbert & Stainier, 2011).

Les EC *tips* sont très mobiles et grandement déstabilisées par le processus angiogénique. Ce sont donc d'autres cellules endothéliales, voisines, qui assurent le maintien d'une connexion avec le vaisseau préexistant. Ces cellules sont dites **cellules suiveuses basales**, ou *stalk*. Elles ne présentent pas d'extensions filopodaires mais contribuent à la **formation d'un lumen précoce**, ou lumière, pour le vaisseau naissant. L'expansion du lumen, induite par la signalisation de VEGF-A, fait intervenir le recrutement de la myosine non-musculaire de type II à la surface apicale des EC suiveuses. Ces dernières demeurent fortement interconnectées par des complexes protéiques appelés **jonctions d'ancrage**. L'établissement d'un lumen central se produit lorsque les EC

suiveuses acquièrent une polarité membranaire ; elles se repoussent alors l'une l'autre (Herbert & Stainier, 2011).

La plupart des agents moléculaires influençant la sélection des EC *tips* et suiveuses ont été déterminés (voir section 2.1.1.3) et sont de nature transitoire, puisque les deux types cellulaires partagent une même destinée au sein du vaisseau mature. De façon intéressante, la diversité des phénotypes des EC dans le microenvironnement du bourgeon est indicative d'un contrôle minutieux de la signalisation des protéines impliquées, en termes de localisation et de dynamique. Ce contrôle pourrait notamment être mené par un équilibre entre un état diffusif et un état séquestré, soit en solution ou immobilisé.

Résolution : interconnexion du réseau et maturation du vaisseau

C'est lors de la rencontre entre deux branches dans l'environnement périvasculaire que les EC *tips* répriment leur comportement exploratoire et que l'interconnexion du réseau, ou **anastomose**, a lieu (**Figure 2-2.C**). Le recrutement sur le mur vasculaire de **péricytes** pour les capillaires et de **cellules musculaires lisses** pour les vaisseaux plus larges représente l'étape critique pour assurer la stabilisation du jeune vaisseau. C'est enfin lors du dépôt de matrice extracellulaire sur sa surface externe qu'il atteint sa **maturité** (**Figure 2-2.D**). L'établissement complet du **flux sanguin** permet l'apport en oxygène aux cellules vasculaires jusqu'alors en conditions hypoxiques. Le retour à la normoxie, associé au contact direct avec les péricytes, inhibe finalement le comportement prolifératif des EC. Les cellules endothéliales retournent ainsi dans leur état de quiescence, tandis que les cellules murales, les limitantes élastiques et la matrice extracellulaire fournissent au vaisseau ses propriétés mécaniques (résistance et souplesse) et le contrôle neural (**Figure 2-1.D**). Le devenir ultime du vaisseau est sa spécialisation au niveau moléculaire en fonction des besoins du tissu, ou lit vasculaire, qu'il dessert (Herbert & Stainier, 2011).

Il convient de noter que le réseau vasculaire nouvellement formé est souvent trop dense par rapport aux besoins du tissu, et qu'un nombre important de vaisseaux subissent une régression. La théorie la plus largement acceptée est que ce processus est à l'inverse du bourgeonnement : occlusion du lumen, arrêt du flux sanguin et mort cellulaire par apoptose (Korn & Augustin, 2015).

2.1.1.3 Signaux moléculaires de l'angiogenèse bourgeonnante

Le processus d'angiogenèse bourgeonnante est contrôlé au moyen d'une cohorte de molécules effectrices et de régulateurs. L'équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques régule l'activation des cellules endothéliales, également appelée **commutateur angiogénique**, ou *switch*. L'on notera que certains signaux sont exprimés de façon constitutive, tandis que d'autres le sont dans une fenêtre temporelle fine (Bergers et al., 2000). Cette section présente les composantes principales qui vont s'avérer pertinentes pour le projet de recherche, et le lecteur est renvoyé vers des articles de revue pour une description exhaustive du sujet (Carmeliet & Jain, 2011; Herbert & Stainier, 2011; Jain, 2003).

Plusieurs familles de facteurs de croissance ont été présentées comme étant critiques pour l'activation et la résolution du commutateur angiogénique, ainsi que pour la maintenance des vaisseaux. Elles incluent la famille du facteur de croissance des fibroblastes (FGF, pour le recrutement des péricytes), la famille du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF, pour la biologie des cellules endothéliales), le facteur de croissance transformant (TGF- β) et les angiopoïétines (ANG) (Carmeliet & Jain, 2011).

Parmi eux, le **facteur de croissance endothélial vasculaire VEGF-A** se démarque en tant qu'acteur prédominant. *In vitro*, son pouvoir d'activation des EC est manifestement supérieur (Del Amo, Borau, Gutierrez, Asin, & Garcia-Aznar, 2016) et, *in vivo*, la suppression d'un seul allèle du gène VEGF-A entrave le développement vasculaire et cause la létalité embryonnaire chez les souris (Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003). Sa signalisation est en général l'étape limitante du processus, et il a été démontré qu'il est essentiel à la fois pour l'initiation de l'angiogenèse et la régulation du système vasculaire chez l'adulte (Simons, 2012). VEGF-A est de plus impliqué dans de nombreux aspects de l'angiogenèse bourgeonnante, notamment la migration, la prolifération et la survie des EC.

Les **angiopoïétines** et leurs récepteurs attirent de plus en plus l'attention. Le rôle des récepteurs TIE2 apparaissait initialement limité à la régulation de VEGF (Risau, 1997), mais la découverte plus récente de leur ligand, les angiopoïétines, a permis d'éclaircir leur mode opératoire. En particulier, ANG1 est libéré par les péricytes imbriqués dans le mur du jeune vaisseau et promeut le retour à la quiescence et la survie des cellules endothéliales via l'activation du récepteur TIE2 (Jain, 2003). ANG2 est quant à lui un antagoniste de la signalisation ANG1/TIE2 : la

formation du complexe ANG2/TIE2 induit l'apoptose des EC en absence de VEGF et contribue ainsi à l'élargage des vaisseaux. À l'opposé, la liaison d'ANG2 à TIE2 provoque le bourgeonnement des EC en présence de VEGF (Augustin, Koh, Thurston, & Alitalo, 2009).

La **matrice extracellulaire** (ECM), et plus spécifiquement les interactions cellule-matrice, sont cruciales pour l'angiogenèse. Ces interactions impliquent les protéines membranaires et celles intégrées dans la matrice, et sont ainsi grandement dépendantes de la dégradation locale de la matrice. Ce sont les protéases extracellulaires qui régulent l'intégrité de l'ECM et maintiennent l'équilibre entre cytokines pro- et anti-angiogéniques. Elles incluent deux principales familles d'enzymes : les métalloprotéases matricielles (MMP) et le système activateur du plasminogène (PA)-plasmin. Il a été déterminé que leur activité est critique pour (i) l'activation de l'angiogenèse (dégradation de la membrane basale, migration cellulaire et formation du lumen), (ii) la régulation de l'activité des cytokines (activation de TGF- β , libération de FGF, TGF- β et VEGF liés à l'ECM) et (iii) pour la génération de produits d'inhibition tels que l'angiostatine, la tumstatine et l'endostatine (Pepper, 2001). Les **statines** sont des produits de dégradation de la matrice extracellulaire. L'angiostatine, l'endostatine et la tumstatine, dérivés respectivement du plasminogène, du collagène XVIII et du collagène VI, agissent principalement comme inhibiteurs de l'angiogenèse. Par exemple, l'angiostatine inhibe l'activation du plasminogène (Pepper, 2001), tandis que l'endostatine ou de fortes concentrations de l'atorvastatine (un composé synthétique) induisent l'apoptose des EC, entravant ainsi la maturation des vaisseaux (Jain, 2003; Urbich, Dernbach, Zeiher, & Dimmeler, 2002). De manière intéressante, il a été démontré *in vitro* qu'à de faibles concentrations l'atorvastatine promeut la migration des EC et la tubulogenèse (Urbich et al., 2002). Ces résultats corroborent l'essentialité d'une distribution locale et finement régulée des molécules régulatrices durant le processus angiogénique.

Les **métalloprotéases matricielles** forment une famille d'enzymes zinc-dépendantes qui sont présentes sous forme diffusible (MMP-1, 2, 3, 8, 9, 10, 11 et 13) ou liées à la membrane (MMP-14, 15, 16, 17 et 21). Leur activité catalytique est spécifique, tout comme l'est celle des **activateurs du plasminogène** dont le seul substrat est le plasminogène. La **plasmin** quant à elle est une protéase à spectre large qui clive de nombreux composants de l'ECM, incluant le plasminogène après son activation. Le système de contrôle apporté par ces diverses protéases est lui-même régulé par d'autres acteurs, notamment les inhibiteurs tissulaires de MMP, les inhibiteurs de PA et l'antiplasmin (Pepper, 2001).

Les **intégrines** sont des récepteurs cellulaires membranaires hétérodimériques. Elles régulent principalement l'adhésion et la migration cellulaire sur l'ECM provisoire durant l'activation angiogénique (Koch & Claesson-Welsh, 2012). Elles peuvent néanmoins interagir avec certains facteurs angiogéniques, telles que VEGF, et leurs récepteurs associés, influant le comportement des cellules endothéliales et musculaires lisses (Carmeliet & Jain, 2011; Chen, T. T. et al., 2010). En particulier, les intégrines $\beta 1$ sont essentielles à la survie des EC, à leur migration et à la maturation des vaisseaux : leur délétion cause la mortalité embryonnaire chez les souris (Malan et al., 2010).

Les **protéines de jonction** modèrent la communication et l'adhésion intercellulaire ainsi que la perméabilité vasculaire. Elles peuvent de plus former des complexes transmembranaires reliés au cytosquelette, appelés complexes d'ancrage. Parmi elles, la cadhérine neurale est critique pour la communication entre la matrice et les cellules murales (Carmeliet & Jain, 2011). La **cadhérine endothéliale vasculaire** (VE-cadhérine) présente aux jonctions entre cellules endothéliales est un inhibiteur puissant de la signalisation de VEGF : elle réprime la phosphorylation de son récepteur VEGF-R2 dans les cellules quiescentes, mais est internalisée en réponse à l'activation de ce récepteur durant le bourgeonnement (Abraham et al., 2009).

Les **éphrines** et leur récepteurs tyrosine kinases participent également au développement vasculaire. Des données récentes indiquent notamment un rôle de la protéine transmembranaire éphrine B2 dans la régulation de la signalisation de VEGF-R2. L'on notera que l'expression de l'éphrine B2 est confinée aux cellules endothéliales artérielles, tandis que celle de son récepteur EphB4 l'est aux cellules veineuses, ce qui permet leur emploi comme marqueurs pour discriminer les vaisseaux (Adams & Alitalo, 2007).

De nombreux autres agents et paramètres contribuent à la bonne orchestration de l'angiogenèse, notamment les micro-acides ribonucléiques (micro-ARN), l'oxyde nitrique et d'autres dérivés réactifs de l'oxygène, la voie de signalisation Notch (voir section 2.1.3.3) ou encore le stress mécanique causé par le flux sanguin. En effet, l'établissement du flux sanguin contribue au recrutement des cellules murales : le cisaillement mécanique déclenche la production par les EC de certains micro-ARN. Ces derniers éteignent alors la traduction d'inhibiteurs de l'expression de PDGF-BB, rétablissant sa production et le recrutement des péricytes et cellules musculaires lisses (Blau & Banfi, 2001).

Boîte 2-1 : Formation des vaisseaux sanguins : message à retenir

- Le plexus primaire est formé *ex nihilo* par vasculogenèse au début du développement embryonnaire. Il subit ensuite une expansion et un remodelage considérables par angiogenèse, que ce soit au niveau embryonnaire ou après la naissance.
- L'angiogenèse bourgeonnante est initiée par la dégradation de la membrane basale, la sélection et la migration des cellules endothéliales. Elle est résolue par le recrutement des cellules murales, la production d'ECM et le retour des EC à un état quiescent.
- Le facteur de croissance endothélial vasculaire A est un facteur pro-angiogénique primordial dans ce processus, bien que ce dernier mette en jeu un nombre considérable d'autres agents qui ne doivent pas être occultés.

2.1.2 Biologie de VEGF

2.1.2.1 Famille et structure de VEGF

Le facteur de croissance endothélial vasculaire, VEGF, renvoie à une famille de glycoprotéines sécrétées découvertes il y a près de 30 ans par leur capacité à induire la mitogenèse de cellules endothéliales vasculaires. La famille génétique de VEGF comprend VEGF-A, -B, -C et -D et le facteur de croissance placentaire (PlGF) d'origine mammifère, ainsi que VEGF-E d'origine virale et VEGF-F identifié dans le venin de serpent. Parmi eux, VEGF-A apparaît comme médiateur majeur de la formation des vaisseaux sanguins; VEGF-B et PlGF ont une action pro-angiogénique restreinte à certains tissus et à des conditions pathologiques, respectivement; enfin VEGF-C est un inducteur majeur de la lymphangiogenèse (Carmeliet & Jain, 2011; Jain, 2003). C'est pourquoi nous allons porter une attention particulière à VEGF-A.

Les VEGF sont structurellement proches de la famille du facteur de croissance dérivé des plaquettes, PDGF : ces facteurs de croissance sont des homodimères dont les chaînes antiparallèles sont liées par ponts disulfures (**Figure 2-3**) (Olsson, Dimberg, Kreuger, & Claesson-Welsh, 2006).

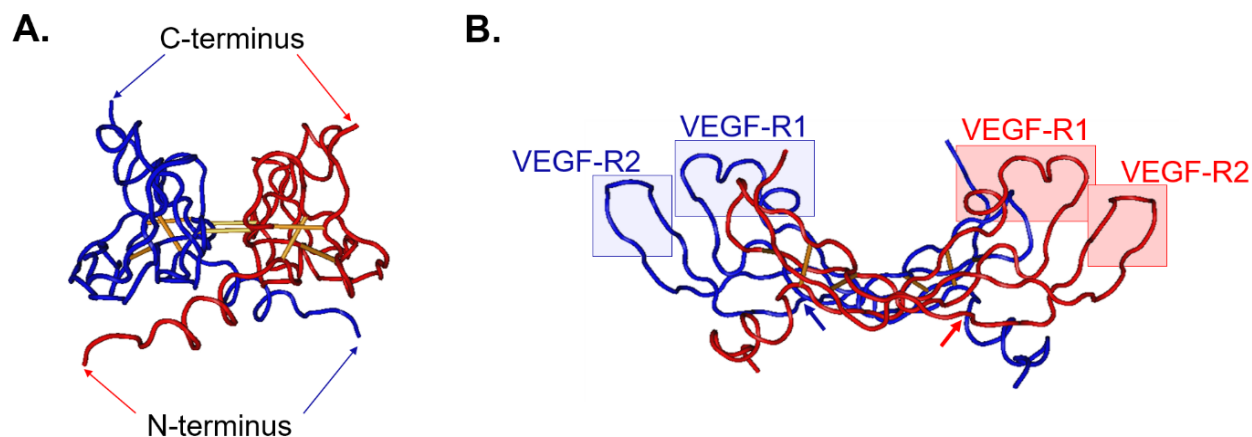


Figure 2-3 : Structure cristalline de VEGF₁₁₀.

(A) Vue latérale présentant la dimérisation antiparallèle, les ponts disulfures intra- et inter-chaînes sont indiqués en jaune. (B) Vue transversale présentant les sites de liaison aux récepteurs VEGF-R1 et VEGF-R2. Les flèches indiquent le site de glycosylation. Figure produite avec le logiciel Cn3D à partir des données structurales de (Muller et al., 1997).

Deux résidus cystéines ont été rapportés comme essentiels à la dimérisation de VEGF-A, cette dernière étant un prérequis pour son activité biologique (Claffey, Senger, & Spiegelman, 1995; Neufeld & Kessler, 2008). Le facteur de croissance présente un site de N-glycosylation au résidu asparagine en position 75 chez l'humain (74 pour VEGF murin), mais sa glycosylation n'est pas requise pour son activité biologique (Claffey et al., 1995).

2.1.2.2 Régulation de VEGF

Expression

La **privation d'oxygène et de glucose** dans des tissus ischémiques, c.-à-d. faiblement irrigués, stimule la transcription du gène VEGF-A et améliore la stabilité de son ARN messager. Ces mécanismes sont régulés positivement par le **facteur induit par l'hypoxie 1** (HIF-1), lui-même régulé négativement par l'ubiquitine ligase de von Hippel-Lindau (Rahimi, 2012; Risau, 1997). Les conditions hypoxiques qui stabilisent HIF-1 stimulent également l'expression de l'angiopoïétine 2 et de la synthase d'oxyde nitrique (NO) (Jain, 2003). De ce fait, les cellules faiblement desservies par le réseau vasculaire envoient des signaux pour guider la néo-angiogenèse vers les tissus ischémiques. À l'opposé, l'hyperoxie due à un branchement et une perfusion excessifs induit la régression des vaisseaux (Risau, 1997). L'expression de l'ARN messager de VEGF est également stimulée par des facteurs de croissance incluant EGF, TGF- α , TGF- β et PDGF, des cytokines inflammatoires, la famille de facteurs de transcription ETS et des dérivés réactifs de l'oxygène (Ferrara et al., 2003; Koch, Tugues, Li, Gualandi, & Claesson-Welsh, 2011). En outre, les cellules endothéliales possèdent des sondes à oxygène telles que la prolyl hydroxylase (PHD2) qui modèrent leur sensibilité et leur réaction à l'hypoxie, y compris l'expression de VEGF (Carmeliet & Jain, 2011).

L'expression de VEGF-A est ainsi régulée en réponse aux besoins locaux, en situations ischémiques et inflammatoires ou durant la cicatrisation. La stimulation des EC par VEGF est majoritairement paracrine : ce sont d'autres cellules parenchymateuses proches, notamment les VSMC, qui expriment le facteur de croissance. Cependant l'ARN messager et les protéines traduites de VEGF ont été détectées dans des EC pour une signalisation autocrine ou intracrine, ainsi que d'autres types cellulaires (kératinocytes, fibroblastes) (McColl, Stacker, & Achen, 2004).

Épissage alternatif

Le gène VEGF-A humain comprend huit exons et sept introns (voir **Figure 2-4**). L'épissage alternatif du pré-ARN messager (élimination sélective de certains introns) génère **neuf isoformes**, parmi lesquelles cinq ont été largement étudiées. Ils sont nommés d'après le nombre de résidus qui les composent : VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ (Ferrara et al., 2003). Les isoformes les moins fréquentes incluent VEGF_{165b}, qui agit comme régulateur négatif de VEGF₁₆₅ (Woolard et al., 2004) et le rare VEGF₁₁₁ exprimé en présence d'agents génotoxiques (Mineur et al., 2007).

L'essentialité d'une génération d'isoformes multiples a été démontrée par des études sur des souris *knockout* par délétion sélective. Pour toutes les souris à l'exception de celles exprimant mVEGF₁₆₄, la forme murine de VEGF₁₆₅, l'expression d'une seule isoforme conduit à un développement vasculaire altéré et à une importante mortalité périnatale. Similairement, des essais cliniques anti-VEGF ont été menés sur plusieurs isoformes pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, dont l'une des formes est causée par une vascularisation excessive. Ces derniers ont mis en évidence que les thérapies ciblant toutes les isoformes, ainsi que les fragments

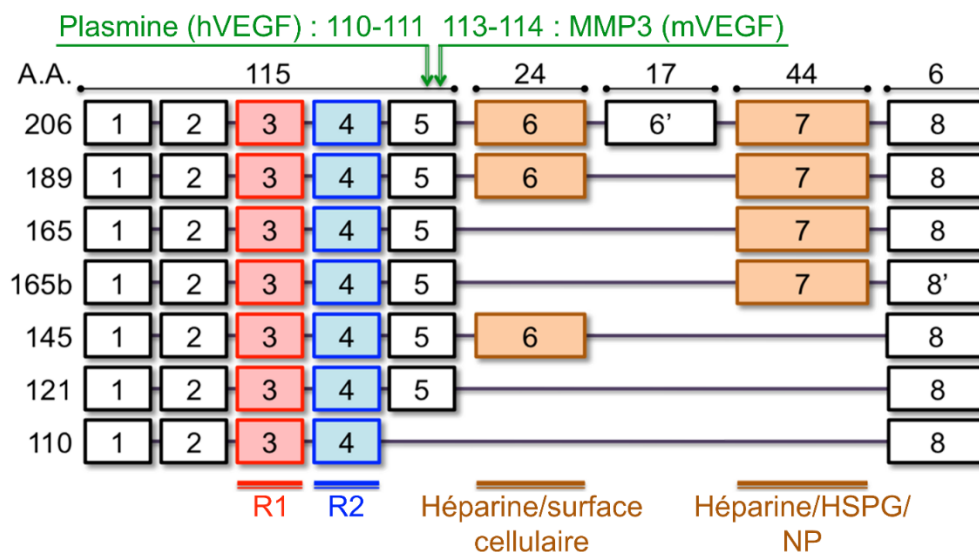


Figure 2-4 : Épissage alternatif de VEGF-A.

Isoformes, déterminants de liaison à VEGF-R1, VEGF-R2 et l'héparine, et sites de clivage par la plasmine et la métalloprotéase matricielle 3.

de VEGF générés par clivage enzymatique, permettaient une inhibition plus efficace de la vascularisation pathologique dans la rétine que celles ne ciblant que certaines isoformes (celles de haut poids moléculaire) (Ferrara, 2010).

Attachement à l'ECM

Comme indiqué dans la **Figure 2-4**, les résidus encodés par les exons 1 à 4 sont omniprésents : ils sont responsables de l'interaction avec les récepteurs VEGF-R1, ou Flt-1, et VEGF-R2, ou KDR. Ces domaines de liaison sont présentés sur la structure de VEGF, **Figure 2-3.B**, et leur rôle biologique détaillé dans la section 2.1.3.

Les isoformes de VEGF-A diffèrent principalement par les résidus encodés par les exons 6 et 7, qui forment des amas basiques impliqués dans la **rétenction surfacique des cellules et la liaison à l'héparine** (Keyt, Berleau, et al., 1996; Keyt, Nguyen, et al., 1996). En particulier, les résidus de l'exon 7 sont homologues au domaine C-terminal de PDGF-B et au domaine de liaison à l'héparine de PDGF-A (Ferrara, 2010). Par conséquent, l'isoforme VEGF₁₂₁, acide et de faible poids moléculaire, est toujours dans un état diffusible, tandis que les isoformes VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆, basiques et de haut poids moléculaire, sont séquestrées à la surface des cellules et de l'ECM (comme le sont PDGF-B et l'isoforme longue de PDGF-A). De façon intéressante, l'isoforme prédominante, VEGF₁₆₅, possède des propriétés intermédiaires : ne manquant que les résidus encodés par l'exon 6, elle se retrouve en équilibre entre une forme soluble et un état immobilisé – des études *in vitro* indiquent un équilibre autour de 50-70% de séquestration (Park, Keller, & Ferrara, 1993). Houck et collègues ont confirmé que les domaines de liaison de VEGF sont **l'héparine et les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG)** par l'observation que les isoformes immobilisées sont déplacées en solution par l'ajout de suramine, d'héparine ou encore d'héparinase (Houck, Leung, Rowland, Winer, & Ferrara, 1992). Plus récemment, Zhao et collègues ont identifié un sous-domaine de 16 unités saccharides qui montre une affinité pour VEGF similaire à celle de l'héparine (Zhao, McCallum, Xiao, Zhang, & Linhardt, 2012).

Traitement protéolytique

En complément d'une libération de VEGF par dégradation de la matrice extracellulaire, le **clivage intramoléculaire** du facteur de croissance par des **protéases** environnementales contribue à sa disponibilité en solution. *In vivo*, les isoformes liées à l'ECM subissent un clivage enzymatique par la plasmine, ce qui génère des dimères dont les domaines encodés par les exons 6, 7, 8 et par

une partie du 5, sont tronqués (cf. **Figure 2-4**). Le fragment libéré (résidus 1 à 110, dénommé VEGF₁₁₀) perd la capacité de se lier aux HSPG mais conserve les sites de liaison aux récepteurs ; il présente une activité mitogénique, bien qu'amoindrie (Houck et al., 1992; Keyt, Berleau, et al., 1996; Lauer, Sollberg, Cole, Krieg, & Eming, 2002; Park et al., 1993). Lee et coll. ont également exploré le traitement protéolytique de VEGF par les métalloprotéases matricielles dans des micro-domaines extracellulaires : la concentration locale de plusieurs d'entre elles, en particulier MMP-3, régule le clivage de mVEGF₁₆₄ en mVEGF₁₁₃, dont le comportement biologique est très proche de celui de VEGF₁₁₀ (Lee, S., Jilani, Nikolova, Carpizo, & Iruela-Arispe, 2005).

La principale raison d'être des longues isoformes de VEGF pourrait ainsi être de constituer un stock de protéines entreposées dans l'ECM et régulées par la dégradation de la matrice et par protéolyse. Leur libération contrôlée permettrait de générer des **gradients** de concentration guidant la migration cellulaire par chimiotaxie et/ou stimulant la prolifération cellulaire à des sites distants (Bergers et al., 2000; Ferrara, 2010). Le rôle de la protéolyse semble cependant aller au-delà de cette transition immobilisé/diffusible. L'étude d'isoformes résistantes aux protéases, qu'elles soient d'origine recombinante ou endogène, a en effet mis en évidence une demi-vie et une activité biologique accrues par rapport aux isoformes présentant les résidus natifs encodés par l'exon 5 (Lee, S. et al., 2005; Mineur et al., 2007; Roth et al., 2006). Qui plus est, les résultats obtenus par plusieurs équipes indépendantes – en utilisant des délétions chez les souris, des tests sur membrane chorioallantoïque, des xénogreffes de tumeur et des tests de fuites vasculaires – ont permis d'éclairer la **complémentarité des molécules diffusibles et immobilisées**. D'une part, lorsque VEGF est seulement présenté en solution, qu'il s'agisse d'isoformes à faible poids moléculaire ou de fragments obtenus par clivage à la plasmine ou aux MMP, il induit l'hyperplasie et la perméabilité vasculaire, soit la formation de vaisseaux à large diamètre et qui fuient. À l'opposé, les isoformes liées à l'ECM promeuvent le bourgeonnement cellulaire et le branchement des vaisseaux, ce qui conduit à un réseau désorganisé de vaisseaux très fins et denses (Houck et al., 1992; Lee, S. et al., 2005; Roth et al., 2006; Ruhrberg et al., 2002).

Boîte 2-2 : Biologie de VEGF : message à retenir

- Le facteur de croissance endothélial vasculaire A est surexprimé en conditions hypoxiques pour induire la formation de vaisseaux sanguins.
- L'épissage alternatif du pré-ARN messager et le traitement protéolytique sont des régulateurs sophistiqués de la biodisponibilité de VEGF et du modelage vasculaire : les formes diffusibles promeuvent la perméabilité vasculaire et l'hyperplasie, tandis que les formes liées à la matrice extracellulaire ou à la surface cellulaire stimulent le bourgeonnement et le branchement vasculaire.

2.1.3 Signalisation de VEGF

2.1.3.1 Récepteurs à VEGF

Trois récepteurs cellulaires ont été identifiés comme apparentés à VEGF, dénommés VEGF-R1 (ou *fms-like tyrosine kinase*, Flt-1 chez la souris), VEGF-R2 (ou *kinase insert domain receptor*, KDR chez l'humain, ou *fetal liver kinase-1*, Flk1, chez la souris), ainsi que VEGF-R3. Succinctement, **VEGF-R1 est impliqué dans la biologie des macrophages et des monocytes** ainsi que la régulation de la signalisation de VEGF-R2; **VEGF-R2 est le régulateur principal de la biologie des cellules endothéliales vasculaires**, en conditions normales et pathologiques; **VEGF-R3 est majoritairement impliqué dans la biologie des cellules endothéliales lymphatiques**. Bien que nécessaire à l'angiogenèse chez le jeune embryon, VEGF-R3 n'interagit pas avec VEGF-A et ne sera donc pas discuté par la suite (Carmeliet & Jain, 2011; Ferrara et al., 2003; Olsson et al., 2006).

Les récepteurs à VEGF présentent une structure similaire : ils comportent un domaine extracellulaire formé de sept domaines d'homologie aux immunoglobulines (domaines *Ig-like*), une seule région transmembranaire responsable de leur dimérisation, un domaine juxtamembranaire suivi d'un domaine kinase possédant un domaine d'insertion de protéine kinase, et enfin un domaine C-terminal (**Figure 2-5**) (Olsson et al., 2006). Ils sont majoritairement dans la membrane des cellules endothéliales sous la forme d'**homodimères**, bien que leur expression dans d'autres types cellulaires et que l'existence d'hétérodimères aient été rapportées (Olsson et al., 2006). Tout comme les VEGF, les VEGF-R peuvent se présenter sous une forme diffusible obtenue soit par épissage alternatif soit par clivage protéolytique. Ces variants solubles, dénommés sVEGF-R1 et sVEGF-R2, semblent agir majoritairement comme des inhibiteurs de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse, respectivement (Albuquerque et al., 2009; Kendall & Thomas, 1993; Raikwar, Liu, & Thomas, 2016). La reconnaissance entre facteur de croissance et récepteur est assurée par les résidus de VEGF encodés par les exons 3 et 4 et par le domaine *Ig-like* 2 chez VEGF-R1, et les domaines *Ig-like* 2 et 3 chez VEGF-R2 (Olsson et al., 2006). Comme indiqué sur la structure cristalline de VEGF (**Figure 2-3**), les sites de liaison à ces deux récepteurs se chevauchent : il y a ainsi une compétition entre eux pour le ligand (Ferrara et al., 2003; Kendall & Thomas, 1993).

La liaison de VEGF à ses récepteurs provoque leur **homo- ou hétérodimérisation**, induisant ensuite leur **phosphorylation**. La présente section met l'accent sur les voies de signalisation majeures actuellement décrites, sur la base de plusieurs articles de revue récents (Koch et al., 2011; Olsson et al., 2006). VEGF-R1 et VEGF-R2 interagissent avec plusieurs ligands : VEGF-A, VEGF-B et PlGF pour le premier, et VEGF-A, VEGF-B et VEGF-C pour le second. Nous nous concentrerons dans cette section à la signalisation de VEGF-A.

2.1.3.2 Signalisation médiée par VEGF-R1

L'affinité de VEGF pour VEGF-R1 est bien plus forte que celle pour VEGF-R2 ; les constantes de dissociation K_D rapportées valant respectivement 7.5-15 et 37-750 pM (Cunningham et al., 1999; Koch et al., 2011; Quinn et al., 1993; Sawano et al., 1996; Terman et al., 1992; von Tiedemann & Bilitewski, 2002; Waltenberger et al., 1994). VEGF-R1 présente de plus une activité tyrosine kinase et une signalisation intracellulaire faibles – bien que suffisantes pour stimuler l'angiogenèse pathologique – qui est partiellement due à la présence d'une séquence de répression dans son domaine juxtamembranaire (**Figure 2-5.A**) (Carmeliet & Jain, 2011). Ces propriétés conjointes accordent à VEGF-R1 un rôle principal de **leurre antagoniste** de l'activité de VEGF (Ambati et al., 2006; Ferrara et al., 2003). La régulation négative de l'activité de VEGF-R2 au moyen du piégeage de VEGF par VEGF-R1 a été largement rapportée. La délétion complète de VEGF-R1 est létale pour l'embryon, tandis que la seule suppression de son domaine tyrosine kinase permet le développement vasculaire. De façon intéressante, un variant obtenu par épissage alternatif, sVEGF-R1, présente de hauts niveaux d'expression : il est complètement diffusible et capable de piéger VEGF circulant (Ferrara et al., 2003).

Cependant, malgré une faible activité tyrosine kinase, la fonction biologique de VEGF-R1 s'étend au-delà de celle d'un leurre à VEGF. En effet, la phosphorylation des résidus tyrosine Y794 et Y1169 de VEGF-R1 peut stimuler la prolifération des cellules endothéliales par l'activation de la phospholipase $C\gamma$. De plus, son activation par VEGF-B et PlGF régule l'activité des monocytes. De nombreuses conditions pathologiques, y compris la croissance tumorale, s'appuient ainsi sur la signalisation de VEGF-R1 pour recruter des macrophages qui vont affecter le comportement des cellules endothéliales. La liaison de VEGF-B ou PlGF à VEGF-R1 dans certaines cellules endothéliales provoque également l'absorption d'acides gras (Hagberg et al., 2010).

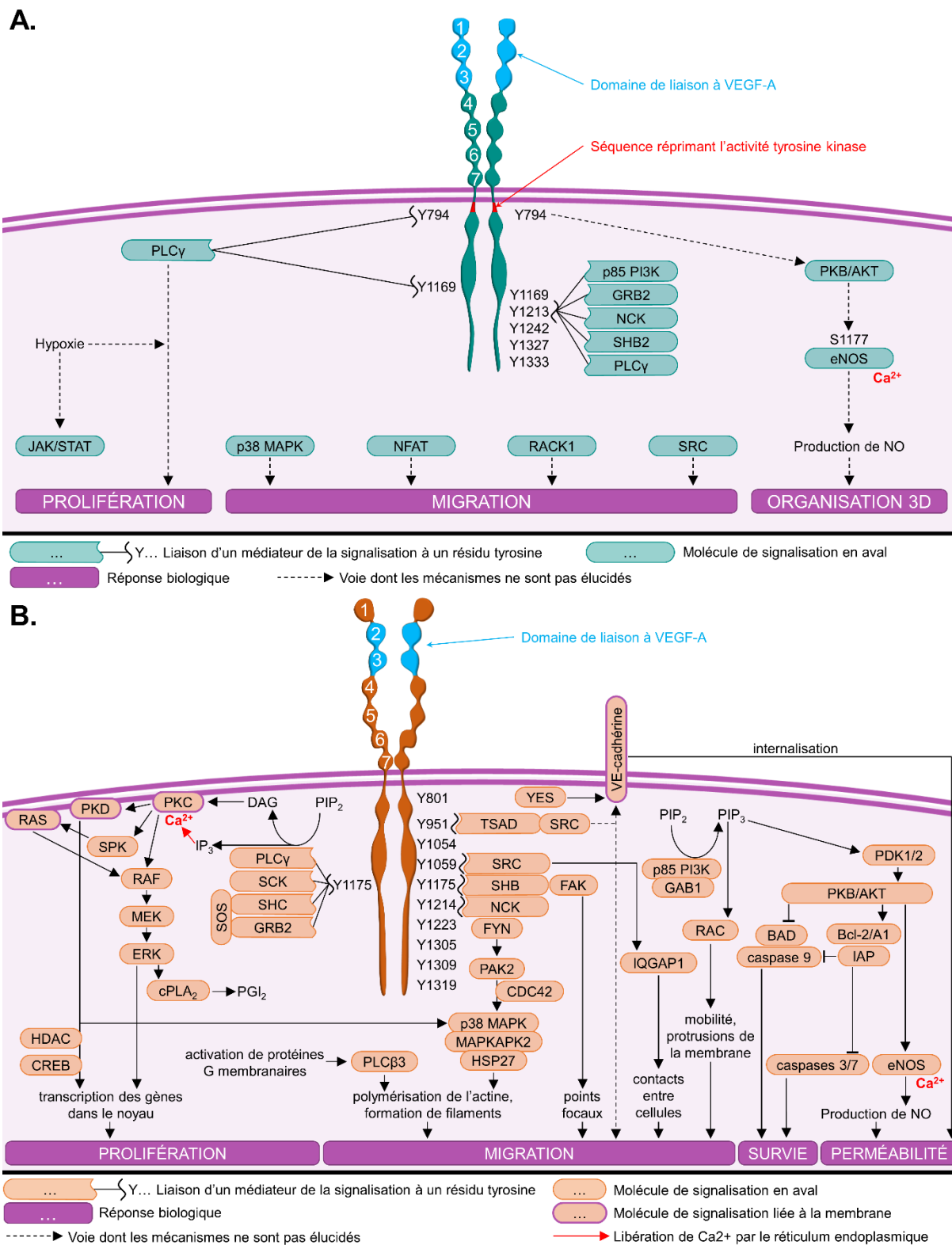


Figure 2-5 : Voies de signalisation des récepteurs (A) VEGF-R1 et (B) VEGF-R2.

Figure adaptée de (Koch et al., 2011).

2.1.3.3 Signalisation médiée par VEGF-R2

VEGF-R2 possède de nombreux sites de phosphorylation qui sont, directement ou indirectement via des protéines adaptatrices, associés aux protéines kinases activées par le mitogène (MAP kinases), le phosphatidylinositol 3' (PI3K), Akt, ERK, la phospholipase C γ et aux petites GTPases (**Figure 2-5.B**) (Herbert & Stainier, 2011). L'inactivation du gène codant pour VEGF-R2, ou la seule mutation du résidu tyrosine Y1175 (Y1173 chez les souris), cause la létalité embryonnaire (Sakurai, Ohgimoto, Kataoka, Yoshida, & Shibuya, 2005). Leur activation peut, entre autres, conduire à la prolifération et à la migration des cellules endothéliales, à la mobilisation du calcium, à la production de prostacycline (PGI₂) et d'oxyde nitrique (NO). On notera que l'activité des sites de phosphorylation varie grandement entre état de quiescence et durant l'angiogenèse. Cependant, les mécanismes assurant la sélection des voies de signalisation à activer en réponse à la phosphorylation de VEGF-R2 restent pour beaucoup à déterminer.

Sélection des cellules endothéliales tips et suiveuses

VEGF provoque la sélection des EC *tips* grâce à l'expression différentielle des VEGF-R et du ligand Notch. Succinctement, l'activation de VEGF-R2 par VEGF promeut l'expression transmembranaire du ligand Notch DLL4 dans les EC *tips*. Ce ligand active à son tour les récepteurs Notch 1, 3 et 4 dans les cellules suiveuses voisines. **L'activation de la voie Notch dans les cellules suiveuses stimule l'expression du leurre VEGF-R1**, ce qui inhibe la signalisation de VEGF-R2 et bloque la formation de filopodes dans ces cellules suiveuses. Inversement, les cellules suiveuses expriment un autre ligand Notch, nommé *Jagged-1*, qui se lie aux récepteurs Notch des cellules *tips* sans les activer. **L'absence d'activation de la voie Notch dans les cellules *tips* stimule l'expression de VEGF-R2** et permet la signalisation de VEGF-A (Herbert & Stainier, 2011). Certaines cellules murales, notamment les péricytes et les VSMC, expriment également les récepteurs Notch 1, 2 et 3 ainsi que les ligands *Jagged-1* et DLL4, qui permettent une communication avec les cellules murales voisines et les cellules endothéliales. Dans l'embryon, l'activation par le *Jagged-1* endothélial de Notch 3 sur les cellules musculaires lisses régule leur recrutement et leur différenciation. De nouvelles études semblent de plus indiquer que la signalisation Notch entre les EC et les cellules murales est médiatrice de la transition endothélio-mésenchymateuse (Kofler et al., 2011).

Migration des cellules endothéliales

Durant le processus migratoire des EC bourgeonnantes, de multiples résidus tyrosines de VEGF-R2 sont phosphorylés, incluant Y951, Y1175 et Y1214 :

- Y951 phosphorylé (pY951) influence la **réorganisation des filaments d'actine** du cytosquelette via la molécule adaptatrice des cellules T, qui induit la formation d'un complexe ternaire avec Src;
- pY801 est suggéré comme nécessaire à la phosphorylation d'Y1059, qui provoque à son tour la phosphorylation de la protéine SHB liée à pY1175; pSHB régule **l'attachement cellulaire et la migration via les points focaux d'adhésion**, par la phosphorylation de la kinase d'adhésion focale (FAK);
- La phosphorylation d'Y1214 entraîne une cascade menant à l'activation des MAP kinases p38, de la protéine de contrôle de la division cellulaire 42 et de la protéine de choc thermique 27, permettant ainsi **la polymérisation et la réorganisation des filaments d'actine**;
- D'autres voies de signalisation ont été proposées, sans être pour l'heure associées à des résidus tyrosines spécifiques de VEGF-R2. Parmi elles, (i) la génération du phosphatidylinositol triphosphate et l'activation de Rac qui causent le **froissement de la membrane cellulaire** par la formation de protrusions contenant des filaments d'actine, (ii) la protéine de liaison à l'actine IQGAP1 qui influe sur la migration cellulaire et (iii) l'activation de PLCβ3 qui est impliquée dans les **contacts entre cellules**.

L'on notera que la formation de filopodes et la migration directionnelle des EC *tips* est associée à des gradients d'isoformes de VEGF liés à l'ECM (Ruhrberg et al., 2002).

Prolifération des cellules endothéliales

L'activation de VEGF-R2 stimule la prolifération des cellules endothéliales au moyen de la voie Ras/Raf/ERK/MAP kinase. La prolifération des EC peut également être déclenchée sans activation de Ras, via l'activation de la protéine kinase C par la phospholipase Cγ associée au résidu tyrosine Y1175 phosphorylé. Cette seconde voie est combinée à l'augmentation cytoplasmique de la concentration de calcium et, en aval, de **l'activation d'ERK**. La prolifération

des EC requiert la translocation nucléaire d'histones désacétylases et est régulée par la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK).

De façon intéressante, l'activation d'ERK ou d'AMPK ne déclenche pas la prolifération cellulaire lorsqu'elle se fait indépendamment de VEGF, ce qui suggère que les deux voies de signalisation agissent conjointement dans le processus prolifératif (Reihill, Ewart, & Salt, 2011).

Survie des cellules endothéliales

L'homéostat vasculaire est marqué par la stimulation de signaux assurant la survie des EC quiescentes composant la monocouche confluyente interne du vaisseau (Herbert & Stainier, 2011). VEGF a été présenté depuis près de 20 ans comme un agent régulateur de la survie des EC, qui met en jeu la voie de signalisation **PI3K/Akt** (Gerber et al., 1998). Les premiers résultats en ce sens ont été observés dans des cellules humaines modèles (cellules endothéliales de veine ombilicale, HUVEC, et cellules microvasculaires dermales). Des études poussées sur des cellules souches hématopoïétiques ont permis par la suite de révéler que la survie cellulaire médiée par VEGF était le résultat d'une boucle autocrine, étant donné que l'addition extracellulaire d'inhibiteurs de VEGF n'affectait pas le comportement cellulaire (Gerber et al., 2002). Il a été également démontré que la survie d'HUVEC était similairement régulée par une boucle autocrine/intracrine (Lee, S. et al., 2007). Plusieurs mécanismes permettent de contrer l'apoptose, ou mort programmée, des cellules :

- La génération de phosphatidylinositol triphosphate induit le recrutement d'Akt à la membrane et sa phosphorylation. **pAkt inhibe alors deux protéines pro-apoptotiques** : la caspase initiateur 9 et le promoteur de mort BAD.
- En parallèle, **VEGF induit l'expression de plusieurs protéines anti-apoptotiques**, notamment Bcl-2 et A1, ainsi que deux inhibiteurs des caspases effectrices 3 et 7, XIAP et survivine.

Perméabilité vasculaire

Le facteur de croissance endothélial vasculaire est aussi connu sous le nom de facteur de perméabilité vasculaire, du fait de sa capacité à induire la fuite des vaisseaux. Ce processus est lié à une contraction des EC et une diminution des contacts intercellulaires, diminuant l'étanchéité du vaisseau. Il est associé à la **production d'oxyde nitrique par la NO synthase endothéliale (eNOS), en réponse spécifique à VEGF**. La présence de NO peut causer l'activation d'Akt et

l'augmentation cytoplasmique de la concentration de calcium provoquant l'activation d'ERK, ce qui stimule respectivement la migration ou la survie cellulaire, tel que mentionné ci-avant. Cependant, lorsqu'induite par l'activation de VEGF-R2 via VEGF, eNOS est transportée de la membrane plasmique au cytosol, ce qui modifie la réponse cellulaire et induit spécifiquement une hyperperméabilité vasculaire (Duran, Breslin, & Sanchez, 2010).

2.1.3.4 Destin de VEGF-R2

Des données récentes sur l'activation des récepteurs tyrosine kinase ont causé la révision d'un paradigme primaire, et ont notamment mis en évidence le rôle majeur de l'endocytose et du trafic intracellulaire dans la signalisation de VEGF-R2 (Gaengel & Betsholtz, 2013; Lanahan et al., 2010). En particulier, de nombreuses protéines associées au récepteur sur la membrane cellulaire (voir section 2.2.3), ainsi que l'isoforme de VEGF impliquée, influencent l'endocytose et le trafic intracellulaire (Fearnley et al., 2016). Malgré ces découvertes majeures, un grand nombre de questions restent en suspens, en particulier vis-à-vis du rôle des complexes formés avec les corécepteurs présentés ci-avant et de la sélection des voies de signalisation (Simons, Gordon, & Claesson-Welsh, 2016).

Déphosphorylation à la membrane plasmique

La **cadhérine endothéliale vasculaire** joue un rôle majeur dans l'inhibition de la prolifération des EC en réponse à VEGF. En effet, dans la tunique endothéliale quiescente, les jonctions intercellulaires serrées et les composants de l'ECM promeuvent l'association de VEGF-R2 à la VE-cadhérine et aux intégrines $\beta 1$. Ces molécules d'adhésion bloquent l'endocytose de VEGF-R2 et maintiennent le récepteur à proximité de **protéines phosphatases de phosphotyrosine** (PTP). Parmi ces dernières, certaines sont transmembranaires, telles que la PTP endothéliale vasculaire (VE-PTP) et la phosphatase stimulée par la densité (DEP-1), ou intracellulaires, comme la PTP-1B qui est liée au réticulum endoplasmique (Anderie, Schulz, & Schmid, 2007).

Lorsqu'elles se lient à VEGF-R2, les phosphatases déphosphorylent les résidus Y1054, Y1059, Y1175 et Y1214, responsables de l'activation des voies PLC γ , ERK et MAP kinase p38, inhibant ainsi la migration et la prolifération des cellules endothéliales (voir section 2.1.3). VEGF-R2 apparaît ainsi **confiné à la membrane plasmique** dans les cellules endothéliales quiescentes.

Néanmoins, le récepteur lié à la membrane conserve sa capacité à activer la voie PI3K/Akt, assurant la survie et la production de NO au sein de la monocouche confluente (Chabot, Spring, Gratton, Elchebly, & Royal, 2009).

Un grand nombre d'études récentes ont mis en évidence l'aspect critique des phosphatases dans la régulation à la fois négative et positive de la signalisation de VEGF-R2. Ces enzymes pourraient ainsi devenir une cible d'intérêt dans le traitement thérapeutique de l'angiogenèse pour le traitement de nombreuses pathologies (Corti & Simons, 2017).

Endocytose

En l'absence de jonctions d'ancrage, c'est la liaison de VEGF à VEGF-R2 qui déclenche son activation et son internalisation – bien qu'une faible proportion de récepteurs soit activée en l'absence de VEGF, notamment en cas de stress mécanique, ou via d'autres ligands (Koch et al., 2011; Simons et al., 2016). L'endocytose peut être **clathrine-dépendante** ou clathrine-indépendante, le premier type étant prépondérant pour VEGF-R2 (Lampugnani, Orsenigo, Gagliani, Tacchetti, & Dejana, 2006). La bonne internalisation du récepteur est nécessaire à l'activation appropriée des voies de signalisation, notamment pour la **prolifération** et la **formation de filopodes** dans les EC *tips*, mais aussi pour la **phosphorylation** même du récepteur (Anderson, Shergill, et al., 2011; Chen, T. T. et al., 2010; Sawamiphak et al., 2010). **Le temps de résidence du récepteur activé à la membrane**, son taux d'endocytose et son trafic intracellulaire sont autant de paramètres influençant la signalisation, bien que leur coordination et leurs rôles respectifs restent à éclaircir (Simons et al., 2016).

Trafic, recyclage et dégradation

À la suite de l'endocytose clathrine-dépendante, les complexes de récepteurs sont stockés dans des **endosomes précoces** qui présentent les marqueurs Rab4, Rab5 et EEA-1 (Ballmer-Hofer, Andersson, Ratcliffe, & Berger, 2011; Chen, T. T. et al., 2010). Un complexe de synectine et de myosine-VI entraîne leur **transport vers le cytosol**, ce qui protège VEGF-R2 de la phosphatase PTP-1B (Lanahan et al., 2010). C'est au cours du transport que les voies ERK et MAP kinase sont activées, permettant la migration et la prolifération cellulaires (Sorkin & von Zastrow, 2009).

Par la suite, les endosomes précoces évoluent en **endosomes tardifs**, porteurs du marqueur Rab7 et capables de fusionner avec les lysosomes, ou en **endosomes de recyclage** porteurs du marqueur Rab11. Plusieurs paramètres moléculaires déterminant la localisation de VEGF-R2 dans

ces endosomes ont pu être identifiés. Par exemple, la liaison au corécepteur NP1 redirige le trafic de VEGF-R2 vers la voie du recyclage (Ballmer-Hofer et al., 2011). On pourra noter que la vitesse de recyclage peut varier, et il a été démontré qu'elle influence l'activation de molécules en aval, tout particulièrement ERK dans les endosomes Rab5 (Lampugnani et al., 2006). À l'opposé, le recrutement dans l'endosome précoce d'ubiquitine ligases telles que c-Cbl induit l'ubiquitinylation de VEGF-R2; VEGF-R2 ubiquitinylé est alors redirigé vers le protéasome 26S, au sein duquel son domaine C-terminal est clivé. Il en découle une régulation négative des voies Akt, eNO synthase et MAP kinase. Le fragment est finalement dirigé vers les lysosomes pour être dégradé (Bruns et al., 2010).

D'une façon similaire, le récepteur VEGF-R1 activé est internalisé via un mécanisme clathrine-dépendant, en association avec deux protéines (c-Cbl et CD2AP) au sein d'un endosome précoce Rab4 (Kobayashi, Sawano, Nojima, Shibuya, & Maru, 2004). Ce complexe ternaire est responsable de l'élargissement de l'endosome et de l'ubiquitinylation du récepteur; ce dernier est ainsi dirigé vers la voie de la dégradation (Cormont et al., 2003). À notre connaissance au moment de la rédaction de cette thèse, aucune voie de recyclage n'a été reportée pour VEGF-R1 (Koch et al., 2011).

2.1.3.5 Formation de complexes et signalisation

Hétérodimères

Dans certaines cellules endothéliales exprimant un nombre de VEGF-R2 largement supérieur à VEGF-R1, des hétérodimères VEGF-R1/VEGF-R2 se forment. Ces derniers permettent la transduction de certains signaux angiogéniques et le contrôle de certains processus, tels que la mobilisation du calcium ou encore l'expression de MMP et de l'activateur du plasminogène. Les hétérodimères peuvent représenter jusqu'à 50% des complexes actifs dans les cellules exprimant les deux récepteurs. Similairement, des hétérodimères VEGF-R2/VEGF-R3 ont été rapportés : ils régulent quant à eux la signalisation de VEGF-C et VEGF-D dans les EC lymphatiques (Dixelius et al., 2003).

Complexes VEGF-R/NP

Les **neuropilines** (NP) ont été initialement décrites comme des récepteurs aux sémaphorines guidant la croissance des axones. De plus en plus d'éléments tendent à montrer qu'elles jouent également un rôle crucial dans l'angiogenèse. Tant la neuropiline-1 que la neuropiline-2 sont exprimées dans les cellules endothéliales et capables de former des complexes avec les VEGF-R. La première, surtout présente dans les cellules artérielles, est un corécepteur à VEGF-R1 et VEGF-R2, tandis que la deuxième est un corécepteur à VEGF-R3 indispensable à la croissance des capillaires et vaisseaux lymphatiques. NP1 et NP2 présentent une structure similaire, en particulier un court domaine intracellulaire exhibant un domaine de liaison PDZ essentiel à la formation du complexe NP1/VEGF-R2 (Prahst et al., 2008). Les neuropilines 1 et 2 se lient aux isoformes de VEGF-A qui présentent les résidus encodés par les exons 7 et/ou 8 (cf. **Figure 2-4**) (Koch et al., 2011; Soker, Takashima, Miao, Neufeld, & Klagsbrun, 1998). La formation de complexes ternaires VEGF-A/VEGF-R2/NP1 est cependant restreinte aux isoformes présentant les résidus encodés par l'exon 8.

Les fonctions des neuropilines dans l'angiogenèse apparaissent non négligeables. En effet, l'extinction concomitante des gènes codant pour NP1 et NP2 conduit à un sac vitellin complètement avasculaire et à une létalité embryonnaire semblable aux études éteignant l'expression de VEGF-R2 (Takashima et al., 2002). NP1 pouvant se lier à VEGF en l'absence du récepteur, elle peut également séquestrer le facteur de croissance et avoir un rôle anti-angiogénique (Koch et al., 2014). En tant que corécepteurs, les NP régulent la signalisation de VEGF au moyen de mécanismes qui pourraient ne nécessiter aucune interaction directe avec ce dernier. C'est davantage la signalisation de VEGF-R2 induite par VEGF qui est régulée positivement par les neuropilines, affectant ainsi le bourgeonnement, la migration et la survie des EC, ainsi que la perméabilité vasculaire (Adams & Alitalo, 2007; Kawamura et al., 2008; Koch et al., 2011; Pan et al., 2007; Soker et al., 1998). Il apparaît néanmoins que les neuropilines pourraient être des récepteurs à VEGF du type sérine kinase (Neufeld & Kessler, 2008).

Complexes VEGF-R/intégrines

Les **intégrines** sont des protéines transmembranaires qui lient les composants de la matrice extracellulaire et régulent l'adhésion cellulaire. Un récepteur à la vitronectine, l'intégrine $\alpha V\beta 3$, est présentée comme un médiateur majeur de la signalisation de VEGF-R2. Durant les processus de migration et de perméabilisation, la protéine kinase Src est activée et induit la phosphorylation de la sous-unité $\beta 3$ de cette intégrine. Cet état phosphorylé permet sa liaison avec VEGF-R2 phosphorylé, une interaction indispensable à l'activation subséquente des kinases MAP p38 et FAK et ainsi à la migration des EC. Des complexes quaternaires VEGF-A/VEGF-R2/ $\alpha V\beta 3$ /NP1 ont également été rapportés. Les intégrines $\beta 1$, quant à elles, sont impliquées dans la signalisation de VEGF-R2, mais uniquement lorsque ce dernier est activé par VEGF lié à l'ECM (voir section 2.1.3.3). Enfin, il a été montré que les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha 3\beta 1$ peuvent jouer un rôle dans l'adhésion, la migration et la survie des EC, ce en réponse à un stimulus induit par VEGF mais sans l'implication de VEGF-R (Hutchings, Ortega, & Plouet, 2003).

Sulfate d'héparane

Plusieurs isoformes de VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 et NP1 présentent des domaines de liaison aux HSPG. Ces derniers servent ainsi de réservoir de facteurs de croissance, tel que précédemment mentionné, mais aussi de corécepteurs à VEGF en modulant l'amplitude et la durée de la signalisation de VEGF-R, potentiellement en diminuant son internalisation (voir section 2.2.3).

De façon intéressante, **l'héparine**, tout comme le fucoïdane de faible poids moléculaire – un polysaccharide mimant l'héparine que l'on retrouve dans certaines espèces d'algues et d'échinodermes – peuvent modérer la liaison de VEGF à NP1 et/ou VEGF-R2, ce qui démontre à nouveau la complexité de la signalisation de VEGF au travers des complexes récepteurs/corécepteurs (Ashikari-Hada, Habuchi, Kariya, & Kimata, 2005; Lake et al., 2006).

Boîte 2-3 : Signalisation de VEGF : message à retenir

- VEGF-A est impliqué à divers niveaux du processus angiogénique, incluant la formation de filopodes, la migration, la prolifération et l'homéostat des cellules endothéliales.
- VEGF-R1 est considéré comme un leurre, et l'activité biologique de VEGF transite principalement au moyen de VEGF-R2.
- La voie de signalisation de VEGF-R2 activée est sélectionnée en fonction d'un nombre important de paramètres : la présence de corécepteurs et de protéines adaptatrices, son endocytose et son transport intracellulaire.

2.2 Approches technologiques pour la présentation de VEGF et leurs implications

2.2.1 Applications biomédicales de VEGF

La compréhension des mécanismes moléculaires gouvernant l'angiogenèse s'est grandement améliorée au cours de la dernière décennie, ce qui a mené à un certain nombre d'études cliniques fructueuses, notamment des thérapies anti-angiogéniques par l'inhibition de VEGF. À l'opposé, malgré l'intérêt majeur qu'elles provoquent, **le succès d'applications pro-angiogéniques demeure très mitigé**. Comme énoncé par Peter Carmeliet et Rakesh K. Jain, « the revascularization of ischaemic tissues would benefit millions, but therapeutic angiogenesis remains an unmet medical need » (Carmeliet & Jain, 2011). Cette section présente succinctement les principales applications biomédicales pour lesquelles la livraison de VEGF présente un intérêt et a été employée, ainsi que les leçons que nous pouvons en tirer.

2.2.1.1 Greffons et endoprothèses vasculaires

Les maladies cardiovasculaires, première cause de mortalité à l'échelle mondiale, impliquent le plus souvent des ischémies, c.-à-d. une diminution soudaine et locale du débit sanguin. La formation de plaques athérosclérotiques sur la paroi interne des vaisseaux sanguins apparaît comme la cause majeure d'ischémie, obstruant le vaisseau et causant une sténose (voir **Figure 2-6.A-B**) (van Lith & Ameer, 2011). Selon l'étendue de l'occlusion et la stabilité de la plaque, le traitement est préventif (médicamenteux) ou correspond à une angioplastie avec ou sans le déploiement d'une endoprothèse vasculaire (**Figure 2-6.C-D**) ou encore à un pontage. Les **endoprothèses vasculaires** requièrent un traitement chirurgical moins invasif que les **pontages**, et ont démontré leur validité (Michaels & Chatterjee, 2002).

Structures

Les applications cliniques actuelles mettent en jeu des **endoprothèses en métal** nues, des endoprothèses à élution médicamenteuse qui préviennent la croissance cellulaire ainsi que des endoprothèses couvertes d'une fine membrane – ces dernières étant principalement employées pour le traitement des anévrismes aortiques abdominaux. Néanmoins, le contournement du vaisseau

obstrué par l'implantation d'un conduit de déviation reste l'ultime recours pour les sténoses sévères et est largement employé. Les conduits usités peuvent être de type autologue ou homologue, limités par la disponibilité d'un vaisseau sain chez le patient ou un donneur compatible et par la morbidité causée au site de prélèvement, ou encore de type hétérologue, ce qui soulève un problème de biocompatibilité (van Lith & Ameer, 2011).

Un important effort de recherche est ainsi consacré au développement de **greffons synthétiques**. Des conduits à base de poly(tétrafluoroéthylène) expansé (ePTFE), de poly(éthylène téréphtalate) (PET) ou autres polymères (PLCL, PU) sont employés couramment pour les artères de large diamètre (> 6 mm). Cependant, malgré des avancées considérables dans le développement de matériaux biodégradables et bioabsorbables (Ramcharitar & Serruys, 2008), les conduits synthétiques de faible diamètre posent toujours des défis (Noel et al., 2013; Seifu, Purnama, Mequanint, & Mantovani, 2013).

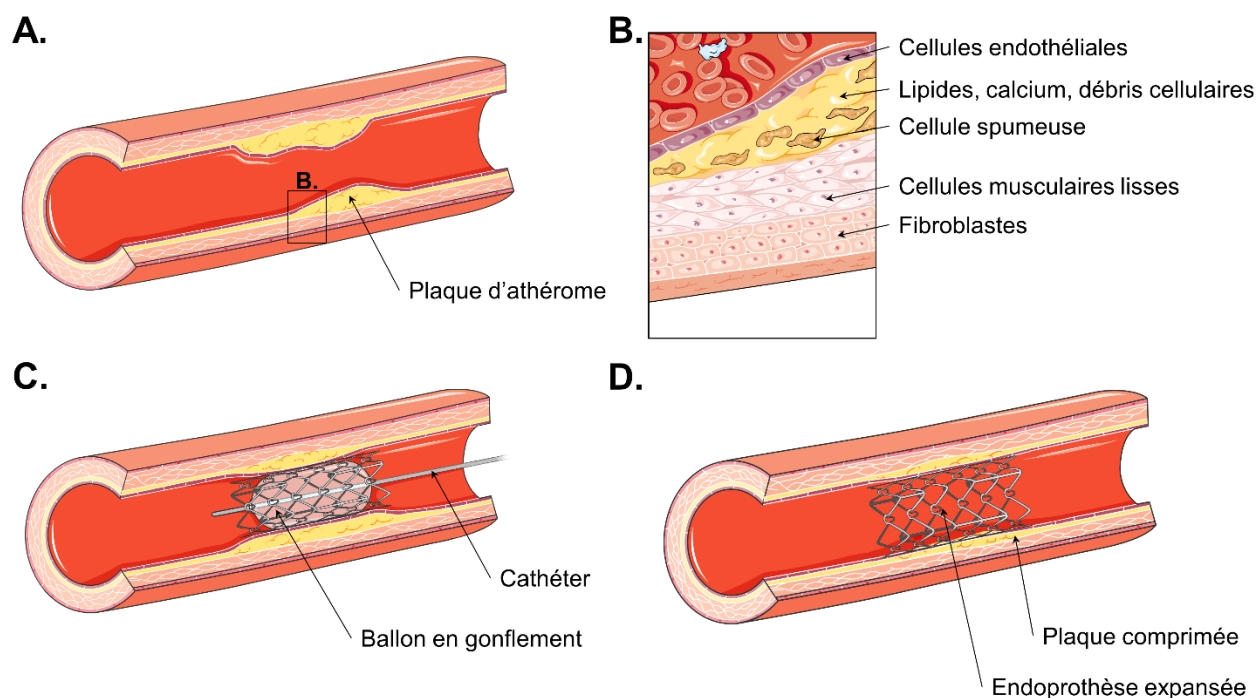


Figure 2-6 : Athérosclérose et déploiement d'endoprothèse.

(A) Plaque d'athérome et (B) composition murale du vaisseau. (C) Déploiement d'une endoprothèse via un ballon introduit par cathéter. (D) Situation au repos après l'intervention.

Figure adaptée de [Servier Medical Art](#).

Cellules

Qu'il s'agisse d'une endoprothèse ou d'un greffon, l'introduction d'un matériau étranger représente une menace pour le corps qui est enclin à répondre par une **réaction immunitaire** aigue et une **resténose**, par le dépôt de plaquettes et la formation d'un caillot (thrombose) ou par prolifération anormale de VSMC (hyperplasie néointimale) (Baron, Dashwood, Arbeus, Filbey, & Souza, 2010). À court terme, la thrombose est le problème majeur, tandis que l'hyperplasie est responsable des échecs des greffons à plus long terme (Devine, McCollum, & North West Femoro-Popliteal Trial, 2004; Randone et al., 2005). Afin de répondre à ces deux défis, de nombreux laboratoires concentrent leurs efforts sur la ré-endothélialisation, soit **le recrutement et la prolifération des cellules endothéliales à la surface** du matériau (Taguchi, Kishida, Akashi, & Maruyama, 2000) ou **leur pré-ensemencement avant implantation** (Bordenave, Remy-Zolghadri, Fernandez, Bareille, & Midy, 1999). La communauté reste cependant divisée entre (pré-)ensemencement *in vitro* et mobilisation *in situ* (de Mel, Jell, Stevens, & Seifalian, 2008; Melchiorri, Hibino, & Fisher, 2013).

Microenvironnement

La **livraison de VEGF** pourrait ouvrir la voie à une ré-endothélialisation accélérée, via la stimulation de la migration des cellules endothéliales avoisinantes et/ou la capture de cellules progénitrices circulantes, ce qui inhiberait la croissance des VSMC et entraverait le dépôt plaquettaire (de Mel et al., 2008). Les travaux préliminaires se sont concentrés sur des injections par bolus intraveineux. Ces derniers ont eu un succès relatif (Van Belle, Maillard, Tio, & Isner, 1997) mais présentent des effets indésirables majeurs, ce qui limite fortement leur pertinence clinique. De nombreux groupes de recherche se sont intéressés à des stratégies de fonctionnalisation de greffons et d'endoprothèses par **immobilisation de VEGF**. Les résultats mitigés n'ont cependant pas permis d'obtenir un consensus sur la validité de cette approche – voir **Tableau 2-1** ci-dessous.

Dans l'ensemble, les études ont démontré un rehaussement de la prolifération et la migration des HUVEC *in vitro* ainsi que de l'endothélialisation *in vivo*, en présence de VEGF. Cependant, plusieurs études animales n'ont pas observé d'amélioration quant à la couverture endothéliale (Lahtinen et al., 2007; Swanson, Hogrefe, Javed, Malik, & Gershlick, 2003). Quant aux VSMC, leur prolifération *in vivo* était soit diminuée (Van Belle, Maillard, et al., 1997), soit

stimulée (Randone et al., 2005), soit inchangée (Swanson, Hogrefe, Javed, Malik, et al., 2003) (voir **Tableau 2-1** et **Tableau 2-2**). De façon intéressante, la stratégie de biofonctionnalisation était différente pour ces trois études : injection de VEGF sous forme diffusible, transfert du gène codant pour VEGF et immobilisation de VEGF par adsorption, respectivement.

Le **mode de présentation de VEGF** pourrait ainsi être une voie qui mériterait d'être explorée pour le développement d'implants à usage biomédical. En particulier, les implications de l'immobilisation de VEGF sur son activité biologique restent à élucider.

2.2.1.2 Génie tissulaire

Le génie tissulaire est un domaine interdisciplinaire qui a émergé durant les années 1980 et qui vise à **développer des substituts biologiques qui restaurent, maintiennent ou améliorent la fonction tissulaire** en cas de maladie, blessure ou ischémie (Cassell, Hofer, Morrison, & Knight, 2002). Les applications concernées sont multiples et comprennent entre autres l'urologie et la cicatrisation ainsi que les pathologies cardiaques, rénales, de l'épiderme ou encore du cartilage. Comme mentionné dans l'introduction, le génie tissulaire est actuellement entravé par **un manque de technologies permettant la vascularisation adéquate et efficace** (Khademhosseini & Langer, 2016). Un système vasculaire stable est en effet un prérequis pour la conception de tissus épais, dans la mesure où la seule diffusion d'oxygène et de nutriments à travers un tissu confluent ne permet pas de soutenir des cellules au-delà d'environ 150-200 μm . Au-delà, les cellules insuffisamment desservies entrent en phase de nécrose (Folkman & Hochberg, 1973). Le support de croissance peut présenter un obstacle supplémentaire, et sa structure tridimensionnelle influence fortement la diffusion d'oxygène (Fiedler et al., 2014). Le défi angiogénique est présenté comme l'obstacle principal aux avancées dans le domaine depuis plus de 15 ans (Cassell et al., 2002). Étant donné la haute complexité du processus angiogénique, il est très difficile de reproduire *in vitro* les conditions adéquates pour générer un réseau organisé et stable de vaisseaux matures (Blau & Banfi, 2001). Des percées ont néanmoins été réalisées via une approche biomimétique, par l'emploi des signaux angiogéniques et/ou vasculogéniques.

Structures

Le système de livraison idéal comprend un matériau biocompatible et biodégradable, capable de retenir protéines et cellules et pouvant être prévascularisé ou vascularisé *in vivo* après implantation. Dans les deux cas, une perfusion rapide est requise pour le maintien et la croissance cellulaires. Par conséquent, un effort important est mené sur la génération d'échafaudages tridimensionnels présentant une stabilité, une taille de pores et un contrôle de la livraison adéquats. Des données récentes indiquent que l'incorporation de microsphères en polymère dégradables au sein de structures tridimensionnelles revêt un grand potentiel à cet effet (Chung, J. C. & Shum-Tim, 2012). Kelm et collègues ont également proposé une approche élégante permettant le développement *in vitro*, sans échafaudage, de vaisseaux par auto-assemblage d'agrégats cellulaires (Kelm et al., 2010). On notera cependant que les cellules sont alors sujettes à un environnement potentiellement hypoxique, notamment si l'épaisseur du tissu dépasse 200 μm , tant que le flux sanguin n'est pas établi. Les nouveaux outils de conception par impression 3D et auto-assemblage modulaire ouvrent également la voie à des architectures complexes mais finement contrôlées (Khademhosseini & Langer, 2016).

Cellules

Le potentiel prolifératif des cellules endothéliales matures étant inférieur à celui des cellules endothéliales progénitrices (Ingram et al., 2005), c'est sur ces dernières que le regard s'est porté pour les applications de génie tissulaire, soit un mimétisme de la vasculogenèse (Melero-Martin et al., 2007). Leur biologie demeure incertaine, dans la mesure où plusieurs populations d'EPC différant par leur phénotype et morphologie ont été décrites. Une application récente implique leur ensemencement avec des cellules périvasculaires (péricytes et/ou VSMC) pour l'obtention *ex nihilo* de vaisseaux sanguins matures (Chung, J. C. & Shum-Tim, 2012). Le domaine a été fortement secoué par la découverte des cellules souches pluripotentes induites, des méthodes permettant de contrôler leur différenciation et de nouvelles méthodes de manipulation génétique. Ces avancées ouvrent notamment la voie de la médecine personnalisée (Khademhosseini & Langer, 2016).

Microenvironnement

Par leur rôle critique dans les étapes de croissance et maturation, les facteurs de croissance pro-angiogéniques ont pour l'heure attiré la plupart de l'attention. Les stratégies pro-angiogéniques, VEGF en tête, prennent de nombreuses formes, telles que **le transfert de gène ou la livraison directe, sous forme diffusible ou immobilisée, de la protéine d'intérêt** (voir le **Tableau 2-1**, ainsi que le **Tableau 2-2** pour celles centrées sur le greffage de la protéine VEGF). Les effecteurs choisis, leur durée d'action, la chronologie de livraison, la distribution spatiale et les doses sont autant de facteurs critiques pour induire la croissance suffisante mais plafonnée de vaisseaux sanguins (Gianni-Barrera et al., 2014; Ozawa et al., 2004; Richardson, Peters, Ennett, & Mooney, 2001). La livraison systémique de protéines n'a pas permis de contrôler ces paramètres, et les risques d'effets secondaires indésirables ont grandement limité leur emploi. À l'opposé, de nouveaux **systèmes de livraison efficaces et polyvalents** ne cessent d'être rapportés, en particulier en chimie clic bio-orthogonale (Khademhosseini & Langer, 2016). Des avancées récentes dans **l'ingénierie des protéines** présentent également une voie de recherche intéressante pour surmonter les problèmes encourus avec les facteurs de croissance naturels, notamment leur courte demi-vie *in vivo* et leur faible rétention au site d'intérêt (Gomes, Leonor, Mano, Reis, & Kaplan, 2012; Moss, Sharma, & Brindle, 2009). En conditions hypoxiques, la stimulation de HIF-1 régule positivement l'expression de facteurs pro-angiogéniques dans les cellules endothéliales, ce qui active les voies de signalisation permettant leur survie et leur prolifération. C'est pourquoi plusieurs études sont actuellement menées sur le **contrôle de la tension en oxygène** dans des structures tridimensionnelles pour promouvoir la croissance vasculaire (Chung, J. C. & Shum-Tim, 2012). La réussite de ces approches reste cependant à démontrer.

Tableau 2-1 : Applications biomédicales et stratégies de présentation de VEGF.

Application	Référence	Stratégie de présentation de VEGF ^a	Essais biologiques ^b	Résultats notables concernant l'activité de VEGF ^c - g/sVEGF : VEGF greffé/soluble /!\ : absence de contrôle adéquat sans VEGF <u>Les effets négatifs dus à VEGF sont soulignés.</u>
Traitement endovasculaire d'anévrisme cérébral	(Wang, Q. et al., 2014)	Immobilisation de hVEGF ₁₆₅ sur un fil de platine couvert d'acide polylactique-co-carbonate de triméthylène et d'héparine	Suivi libération in vitro Traitement d'anévrismes dans des rats	Libération graduelle : 65% en 25 j ↗Vitesse de remplissage du lumen (formation de caillot et dépôt de tissu fibreux) Prolifération d'EC non observée
Vascularisation pour génie tissulaire	(Prakash Parthiban, Rana, Jabbari, Benkirane-Jessel, & Ramalingam, 2017)	Greffage covalent d'un peptide homologue de VEGF dans un hydrogel de gélatine	Encapsulation HUVEC	↗Nombre de vaisseaux interconnectés ↗Expression de vWF, VEGF-R2, ANG2 et CD34
	(Traub et al., 2013)	Greffage covalent d'une chimère (FN _{III10} /mutant de hVEGF ₁₆₅ résistant à la plasmine) dans un gel de fibrine	Cicatrisation de blessure cutanée par incision dans des souris	↗Réponse vasculaire et granulation après 10 j vs gel ± sVEGF Régression de la vasculature après résorption du gel (14 j) Réponse similaire pour gVEGF ± le domaine FN _{III10}
	(Aizawa, Wylie, & Shoichet, 2010)	Greffage covalent de hVEGF ₁₆₅ dans un hydrogel d'agarose (gradient)	Culture EC	Prolifération similaire pour gVEGF et sVEGF ↗Pénétration dans le gel Bourgeonnement et formation de tubules dans toutes les conditions sauf pour des densités trop importantes (saturation des récepteurs?)
Traitement des blessures cutanées par équivalent dermique	(Guo, Xu, Ma, Huang, & Gao, 2010, 2011)	Encapsulation de nanoparticules de chitosane contenant un plasmide codant pour hVEGF ₁₆₅ dans un échafaudage en collagène	Cicatrisation de blessure cutanée (incision ou brûlure) dans des cochons nains	↗Nombre de capillaires et de vaisseaux matures ↗Infiltration de fibroblastes ↗Expression endogène de VEGF
Traitement de l'ischémie du muscle squelettique	(Masaki et al., 2002)	Injection intramusculaire de respirovirus encodant hVEGF ₁₆₅ ou bFGF murin	Suivi à 10 j sur muscle ischémique de membre postérieur de souris	↗Nécrose musculaire, tissu de granulation et amputation avec VEGF ↗Régénération musculaire et ↗ amputation avec FGF (met en jeu VEGF endogène!)
	(Vajanto et al., 2002)	Injection intramusculaire d'adénovirus encodant mVEGF ₁₆₄	Suivi à 30 j sur muscle ischémique de membre postérieur de lapin	Pas de différence entre conditions pour l'atrophie musculaire, la nécrose ou la croissance d'artères collatérales ↗Formation de capillaires pour adénovirus (VEGF ou contrôle galactosidase) ↗Œdème temporaire

Traitement de l'infarctus du myocarde	(Zhang, J. et al., 2009)	Capture d'une chimère (domaine de liaison au collagène/hVEGF ₁₆₅) par du collagène : (i) immobilisation sur une membrane (ii) injection locale et capture in situ	(i) Implantation sous-cutanée dans des rats (ii) Restauration de l'activité après infarctus dans des rats	↗Densité de vaisseaux vs VEGF natif ou collagène nu ↗Capture au niveau du cœur et ↘ distribution systémique vs hVEGF ↗Épaisseur murale, ↗ densité de capillaires et ↘ taille de cicatrice vs VEGF natif ↗Fonctions systolique et diastolique vs VEGF natif
	(Lee, R. J. et al., 2000)	Implantation ventriculaire de myoblastes transformés pour exprimer mVEGF ₁₆₄	Suivi à 15 j sur myocarde non ischémiq de souris	↗Mortalité (5/11) <u>Formation de tumeurs vasculaires</u> Pas de complications si les myoblastes n'expriment pas VEGF
Intégration d'implants endo-osseux	(Schliephake et al., 2012)	Immobilisation sur des disques de titane d'une chimère de hVEGF ₁₆₅ par l'hybridisation de deux brins d'ADN	Suivi libération in vitro	↗Quantité totale immobilisée vs VEGF natif Libération graduelle sur 7 j puis plateau (!quantités absolues similaires avec ou sans l'ADN)
			Culture HUVEC	↗Prolifération sur VEGF immobilisé
			Culture MSC	Différentiation similaire avec ou sans l'ADN (expression de vWF pour VEGF libéré)
	(Lode et al., 2007)	Adsorption de hVEGF ₁₆₅ à la surface de ciment osseux en hydroxyapatite (après durcissement)	Suivi libération in vitro Culture HDMEC	Libération graduelle (15-25% en 7 j) puis ralentissement (< 1% par jour) Activité biologique de VEGF libéré vs VEGF frais : ↘ si VEGF greffé sur ciment nu ↗ si VEGF adsorbé sur ciment modifié avec collagène+citrate ou phosphosérine
Régénération osseuse par substituts	(Midy, Hollande, Rey, Dard, & Plouet, 2001)	Adsorption de hVEGF ₁₆₅ sur une poudre d'hydroxyapatite et apatite carbonatée (avant durcissement)	Suivi libération in vitro Culture FBAEC	Libération rapide (27% en 2 h) puis arrêt Activité biologique de VEGF libéré supérieure si adsorbé sur hydroxyapatite
Traitement de l'athérosclérose par greffon vasculaire synthétique	(Zhang, H. et al., 2013)	Double encapsulation de hVEGF ₁₆₅ (couche interne) et PDGF (couche externe) dans un hydrogel de chitosane+PELCL+héparine électrofilé	Suivi libération in vitro	Libération graduelle : 95% en 28 j (avec libération initiale de VEGF rapide : 50% en 3j)
			Culture EC	↗Prolifération (avec ou sans PDGF)
			Culture VSMC	↗Prolifération (<u>meilleure sans VEGF</u>)
	(Randone et al., 2005)	Immobilisation de hVEGF sur un greffon de PTFE expansé par co-incubation avec un ECM artificiel (laminine, collagène et entactine)	Suivi à 28 j sur greffon interposé dans artère carotide de lapins Suivi à 30 j sur greffon interposé dans l'artère abdominale de rats	↗Couverture endothéliale interne ↗Densité VSMC à la surface externe Pas de thrombose pour toutes conditions ↗Épaisseur de l'intima avec ECM ± VEGF ↗Couverture endothéliale ↗Densité <u>luminale</u> de VSMC

Traitement de l'athérosclérose par endoprothèse vasculaire	(Liu, Y. et al., 2015)	Encapsulation de hVEGF dans des particules d'héparine/polylysine puis greffage covalent sur du titane+polydopamine	Suivi libération in vitro Thrombogénicité Culture MSC et HUVEC	Libération graduelle : 40% en 30 j ⚡Temps de coagulation et adhésion plaquettaire pour titane+particules (±VEGF) vs titane nu ⚡Adhésion/prolifération et vitesse de migration
	(Wang, H. G. et al., 2013)	Fonctionnalisation de disques de titane+polyéthylène imine avec VEGF et héparine couche par couche	Thrombogénicité Culture HUVEC	⚡Temps de coagulation et adhésion plaquettaire vs titane nu /!/ ⚡Prolifération et étalement + synergie avec FN
	(Paul, Shao, Shum-Tim, & Prakash, 2012)	Fonctionnalisation de la prothèse en acier inox. avec un hydrogel de fibrine + nanotubes de carbone + nanoparticules contenant un plasmide codant pour VEGF et ANG1	Suivi à 6 semaines sur prothèse déployée dans l'artère fémorale de chien	⚡Couverture endothéliale ⚡Sténose et occlusion intimale Expression transitoire des protéines (arrêt entre 2 et 6 semaines)
	(Tang et al., 2011)	Pré-ensemencement de la prothèse en acier inox. recouverte de polylysine+glutine avec des HUVEC transformées pour surexprimer VEGF ₁₂₁	Suivi à 12 semaines sur prothèse déployée dans l'artère aortique abdominale de lapins (histologie, SEM)	⚡Couverture endothéliale ⚡Hyperplasie néointimale et de l'adhésion plaquettes et globules rouges /! Pas de contrôle HUVEC non transformées
	(Lahtinen et al., 2007)	Injection de plasmides codant pour hVEGF ₁₆₅ sur des greffons en PTFE expansé	Suivi à 18 mois sur greffon interposé dans l'aorte infrarénale de rats Suivi à 43 semaines sur greffon interposé dans l'aorte infrarénale de lapins Suivi à 6 semaines sur greffon interposé dans les artères carotide et fémorale de chiens	⚡Endothélialisation (complète à 18 mois) <u>Aucune endothélialisation si bFGF coadministré</u> ⚡Endothélialisation à 2 semaines puis <u>couverture similaire voire inférieure aux contrôles</u> ⚡Mortalité pour greffons fémoraux Endothélialisation partielle pour toutes conditions
	(Van Belle, Maillard, et al., 1997) (Van Belle, Tio, et al., 1997)	Injection locale de hVEGF ₁₆₅ par ballon après déploiement de la prothèse en acier inox.	Suivi à 28 j sur prothèse déployée dans l'artère iliaque de lapins	⚡Hyperplasie néointimale et occlusion luminale Pas de thrombose pour toutes conditions

^aStratégie – acronymes et abréviations : ANG : angiopoïétine; ECM : matrice extracellulaire; FN_(III10) : fibronectine (sous-domaine III-10); PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes; PELCL : polyéthylène glycol-poly(caprolactone-co-acide lactique); PTFE : polytétrafluoroéthylène;

^bEssais biologiques – acronymes et abréviations : FBAEC : cellules endothéliales d'aorte de fœtus bovin; HDMEC : cellules endothéliales microvasculaires dermales humaines; HUVEC : cellules endothéliales de veine ombilicale humaine; MSC : cellules souches mésenchymateuses; VSMC : cellules musculaires lisses vasculaires.

^cRésultats notables – acronymes et abréviations : CD34 : *cluster* de différenciation 34; FGF : facteur de croissance des fibroblastes; vWF : facteur de von Willebrand.

Pour plus d'information et d'autres exemples, le lecteur est renvoyé aux revues suivantes, qui présentent les stratégies les plus prometteuses et les résultats d'études cliniques (Baiguera & Ribatti, 2013; Cassell et al., 2002; Chung, J. C. & Shum-Tim, 2012; Khademhosseini & Langer, 2016; Laschke & Menger, 2012; Phelps & Garcia, 2009). Plusieurs procédures d'analyse y sont également présentées, certaines étant discutées dans le Chapitre 7. L'on notera qu'une myriade de méthodes ont été employées ces 40 dernières années pour évaluer l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*, parmi lesquelles certaines peuvent être biaisées – en particulier pour les essais de culture cellulaire *in vitro* dont l'environnement est physiologiquement peu pertinent. Ainsi, le choix de la méthode d'évaluation et les conclusions tirées des essais doivent être traitées avec grande précaution (Staton, Reed, & Brown, 2009).

Boîte 2-4 : Applications biomédicales de VEGF : message à retenir

- VEGF est un candidat prometteur pour la (ré-)endothélialisation d'endoprothèses et de greffons vasculaires, ainsi que pour la vascularisation de tissus générés *in vitro*.
- Les stratégies employées pour la livraison de facteurs de croissance, tout comme les techniques de validation et les modèles biologiques, sont très variés.
- Le mode de présentation de VEGF paraît être un paramètre clef pour la réussite de l'application.

2.2.2 L'immobilisation de VEGF pour l'angiogenèse thérapeutique

Les résultats mitigés obtenus lors des études employant VEGF pour l'angiogenèse thérapeutique pourraient être expliqués par un manque de connaissance au niveau fondamental. Plus précisément, une meilleure compréhension des implications biologiques du mode de livraison permettrait d'ouvrir la voie au développement fructueux de stratégies pro-angiogéniques. Cette partie de la thèse est ainsi basée sur une prise de recul quant aux mécanismes d'action des facteurs de croissance, et sur une réflexion quant aux paramètres d'immobilisation qui peuvent influencer l'activation de leurs récepteurs et la réponse cellulaire.

2.2.2.1 Considérations générales pour l'immobilisation de facteurs de croissance

Mécanismes d'action des facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des protéines qui apportent des instructions biologiques aux cellules porteuses de récepteurs spécifiques. La réponse cellulaire induite par un facteur de croissance s'appuie sur un processus séquentiel qui débute par la **complexation**, soit l'interaction avec le récepteur associé. La diffusion latérale de multiples récepteurs promeut la complexation (ou agrégation, ou *clustering*), et la **phosphorylation** simultanée qui déclenche la **transduction du signal** d'un côté à l'autre de la membrane. Le complexe peut subir une **internalisation**, et continuer à signaler ou être redirigé vers les voies de **dégradation** ou de **recyclage**.

Cette séquence d'événements dépend de la nature du facteur de croissance, et en particulier de sa présentation en mode (i) diffusif ou (ii) immobilisé. L'interaction entre le facteur de croissance et la cellule peut ainsi être (i) **intracrine**, **autocrine**, **endocrine**, **paracrine**, (ii) **juxtacrine** ou **matricrine** (voir **Figure 2-7**) (Ito, 2009). L'état diffusif ou non-diffusif du facteur de croissance influence grandement l'activation des voies de signalisation, et donc la réponse cellulaire, que ce soit par l'internalisation et le trafic du complexe ligand/récepteur, le recyclage ou encore la durée d'activation du récepteur.

Changement de paradigme : de diffusif à immobilisé

Jusqu'à la fin des années 1990, les stratégies de livraison locale de facteurs de croissance étaient limitées à leur forme soluble et les essais cliniques associés n'étaient pas fructueux (Kuhl & Griffith-Cima, 1996). Une explication pourrait être que la réponse cellulaire ne dépend pas

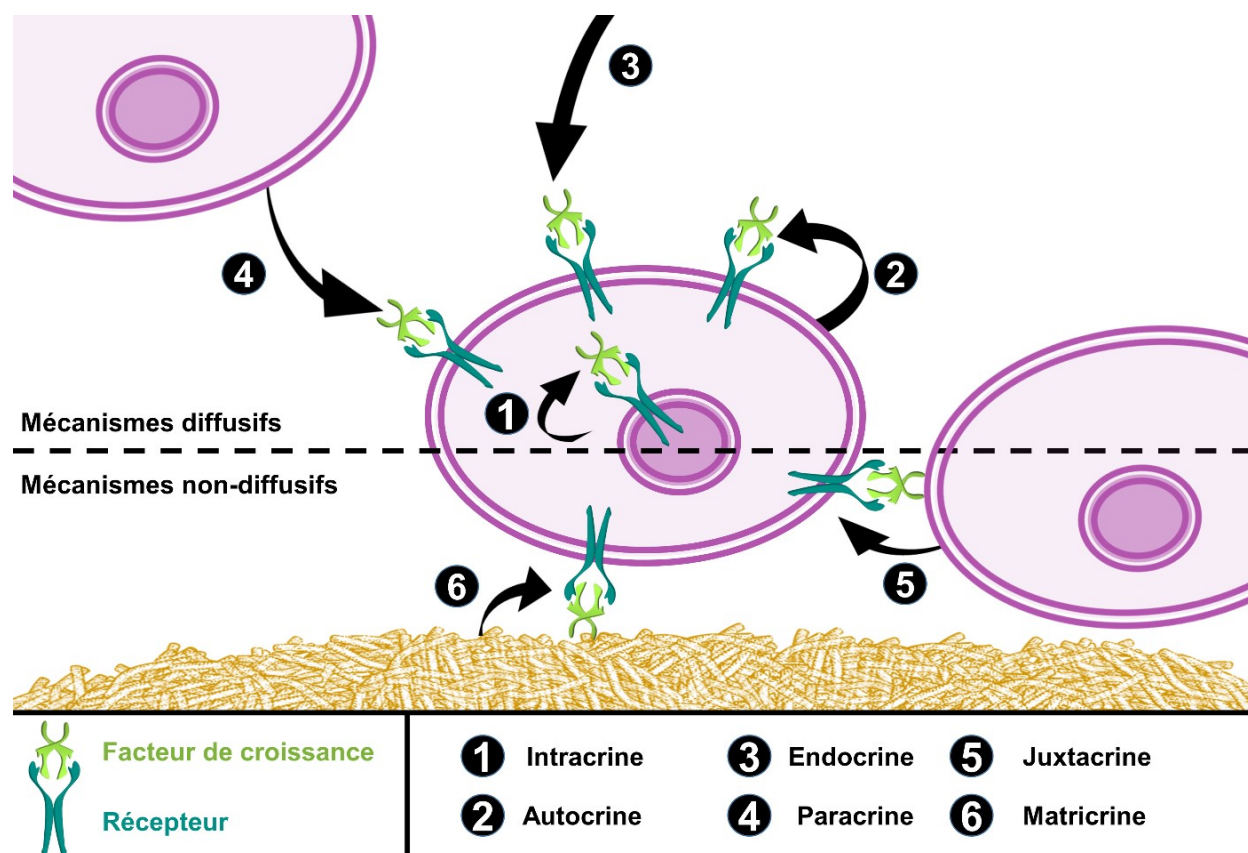


Figure 2-7 : Mécanismes d'action des facteurs de croissance.

Figure adaptée de (Ito, 2009).

seulement de la présence, mais aussi de la durée et de l'amplitude du signal. Pour induire une réponse significative, la plupart des facteurs de croissance nécessitent en effet d'être présents à une concentration adéquate plusieurs heures dans l'environnement cellulaire. Pour des applications en génie tissulaire et en médecine régénératrice, la concentration locale des cytokines doit ainsi être finement contrôlée. Ceci s'avère difficile en employant des facteurs solubles du fait de leur propagation par diffusion, leur assimilation par les cellules et leur dégradation. Leur emploi nécessiterait ainsi la mise en place de systèmes de perfusion en continu qui pourraient augmenter les risques d'effets secondaires.

Un effort important a par conséquent été porté au développement de stratégies de fonctionnalisation permettant soit **la libération contrôlée**, c.-à-d. des systèmes de livraison qui permettent d'approvisionner en continu une quantité régulée de facteurs de croissance au site ciblé,

soit **l'attachement stable**, c.-à-d. des stratégies de greffage empêchant la libération des facteurs de croissance. Selon Ito, les mécanismes impliqués dans l'immobilisation de facteurs de croissances peuvent être décrits comme « juxtacrine et matricrine artificiels », ce qui suggère **la perte de certaines propriétés spécifiques à l'état diffusif lors de leur attachement** au biomatériau (Koch et al., 2011). La question majeure qui se pose lors de l'immobilisation d'un facteur de croissance réside ainsi dans **l'altération possible de leur activité biologique**. Il est en effet indéniable que leur mobilité, leur stabilité et leur dégradation en ressortent altérées, ce qui peut affecter leur interaction avec les cellules.

Paramètres à considérer pour l'immobilisation

L'**orientation** du ligand est un facteur déterminant de sa capacité d'interagir avec les récepteurs cellulaires, ou biodisponibilité. Bien que les stratégies de greffage à orientation aléatoire soient généralement simples à mettre en œuvre, un nombre croissant d'études rapporte des approches permettant une exposition homogène des sites de liaison aux récepteurs, par le biais de couplages à site spécifique (Ichinose, Morimatsu, Yanagida, & Sako, 2006) et/ou d'étiquettes peptidiques (Boucher, Liberelle, Jolicoeur, Durocher, & De Crescenzo, 2009; Nakaji-Hirabayashi, Kato, Arima, & Iwata, 2007; Rao, Anderson, & Bachas, 1998).

Tel que démontré par Ichinose et coll., la **densité surfacique** d'un facteur de croissance immobilisé influence également son pouvoir d'action, par le contrôle de sa capacité à provoquer la dimérisation et l'agrégation des récepteurs (Ichinose et al., 2006). Dans cette étude, l'atteinte d'un seuil minimal a été démontré nécessaire à l'induction d'une réponse cellulaire. À l'opposé, une trop grande densité peut causer un encombrement stérique et limiter la biodisponibilité. L'on notera également qu'une bonne **homogénéité** dans la distribution spatiale de VEGF peut s'avérer critique à l'échelle macroscopique (Gianni-Barrera et al., 2014).

De plus, la capacité des récepteurs à former des complexes dépend de leur diffusion latérale. Un compromis doit ainsi être obtenu quant à la **flexibilité** de l'immobilisation des ligands : une grande flexibilité permet la diffusion à longue portée des récepteurs membranaires, facilitant leur reconnaissance et leur dimérisation (Kuhl & Griffith-Cima, 1996), tandis qu'une stratégie plus restrictive entrave la diffusion et déstabilise les complexes (Ito, 2009). De ce fait, la capacité des récepteurs à former des complexes est altérée lorsque le paradigme change de l'état diffusif à la forme immobilisée, dans la mesure où la formation de complexes de récepteurs actifs devient

dépendante de la densité surfacique et de la mobilité du facteur de croissance. Dans ce contexte, l'insertion d'un bras de liaison entre le substrat et le ligand s'avère très intéressant pour obtenir un greffage spécifique tout en prodiguant une certaine liberté de mouvement.

Le devenir des complexes de récepteurs après endocytose apparaissait de prime abord binaire : les récepteurs internalisés sont soit dégradés dans les lysosomes soit recyclés à la membrane plasmique. En cas de dégradation, le nombre de récepteurs exposés à la surface de la cellule décroît. Si le complexe ligand/récepteur est entièrement internalisé, cela conduit à une diminution concomitante de la concentration locale du facteur de croissance. Ce mécanisme de régulation négative diminue à la fois l'amplitude du stimulus et la sensibilité des cellules au stimulus, ce qui empêche une surstimulation. Dans ce cas, la **libération** du ligand immobilisé est un paramètre clef à contrôler pour réguler la durée du signal. Qui plus est, des études moléculaires ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la dégradation et le recyclage. Par exemple, le recyclage du récepteur EGF-R dépend du ligand activateur. En effet, la stabilité du complexe EGF/EGF-R à faible pH est plus importante que celle du complexe TGF- α /EGF-R. Il en découle une dissociation plus rapide de ce dernier dans le système endosomal, ce qui cause un recyclage plus important d'EGF-R, tandis qu'EGF/EGF-R va être davantage transporté vers le lysosome (Alwan, van Zoelen, & van Leeuwen, 2003).

La **dissociation du complexe ligand/récepteur** avant ou après son internalisation affecte ainsi sa reconnaissance intracellulaire par diverses protéines adaptatrices et protéases, ce qui module *in fine* la transduction du signal. Ces découvertes mettent en évidence que la **stabilité du lien entre le facteur de croissance et le substrat** est un paramètre clef dans le contrôle optimal de la réponse cellulaire. Ceci est d'autant plus critique pour les récepteurs dont certaines voies de signalisation ne s'activent qu'au sein des endosomes après internalisation – ce qui est le cas de VEGF-R2 (voir section 2.2.3).

Enfin, bien que l'internalisation du ligand avec le récepteur activé apparaisse comme l'occurrence prédominante, la **co-dépendance de l'internalisation du complexe ligand/récepteur et de la phosphorylation** n'est pas une généralité. La preuve d'une stimulation cellulaire par un ligand non internalisé a été présentée en 1990 (Wells et al., 1990), et de nombreuses autres études ont corroboré cette découverte (Ito, Chen, & Imanishi, 1998). La

possibilité d'internalisation, qu'il s'agisse du récepteur seul ou du complexe ligand/récepteur, apparaît ainsi comme un facteur qu'il convient de prendre en compte pour notre étude.

2.2.2.2 Interactions substrat/ligand et ligand/récepteur

Classification des stratégies d'immobilisation

Sur la base des considérations présentées ci-avant, il apparaît que la stabilité du greffage, qui module la vitesse de libération et l'internalisation du facteur de croissance, est l'un des éléments les plus critiques. En concentrant notre attention sur ce paramètre, nous pouvons classer les stratégies de greffage comme suit :

- **Interaction en mode diffusif** : le substrat est un vecteur permettant la livraison du facteur de croissance sous un état librement diffusif (p.e. ligand encapsulé dans une structure biodégradable);
- **Interaction en mode non-diffusif avec internalisation** : le lien entre le substrat et le facteur de croissance est stable en conditions physiologiques, et le ligand peut être libéré du substrat et internalisé après sa reconnaissance par le récepteur (p.e. ligand immobilisé par interactions électrostatiques faibles);
- **Interaction en mode non-diffusif sans internalisation** : le facteur de croissance est lié de façon très stable et ne peut être ni libéré ni internalisé par la cellule (p.e. ligand greffé de façon covalente).

Il paraît peu probable qu'une approche soit intrinsèquement meilleure que les autres, mais une stratégie de greffage pourrait sans doute privilégier une application donnée. En effet, bien que de nombreuses études favorisent le greffage covalent pour obtenir une activité prolongée, d'autres insistent sur la nécessité d'un lien labile entre le facteur de croissance et le substrat afin de permettre sa dégradation au moment opportun (Kuhl & Griffith-Cima, 1996). Bien évidemment, toute comparaison entre ces approches ne devra pas omettre les autres paramètres précédemment mentionnés, qui sont l'orientation, la densité et la flexibilité.

Paramètres gouvernant l'internalisation du facteur de croissance

Dans ma perception, le système, représenté schématiquement sur la **Figure 2-8**, comprend **trois composantes majeures** : le substrat, le facteur de croissance et le récepteur associé, ainsi que **deux liaisons** : le lien entre facteur de croissance et substrat, et l'interaction entre facteur de croissance et récepteur. Dans un milieu physiologique complexe, **les cellules et l'environnement extracellulaire exercent un stress** sur le système, qui peut provoquer la libération ou la dégradation du facteur de croissance à plusieurs niveaux (Anderson, Shergill, et al., 2011; Cheng & Garcia, 2013; Salimath et al., 2012):

- Le substrat : sa dégradation peut libérer des fragments de petite taille contenant le facteur de croissance et pouvant être internalisés;
- Le lien entre facteur de croissance et substrat : sa rupture peut mener à la présentation du facteur de croissance dans un état diffusif;
- Le facteur de croissance : sa susceptibilité à certaines protéases et au pH peut nuire à son activité biologique et/ou la libération de fragments diffusibles, et la présence de protéines de haute affinité pour le substrat peut causer sa libération;
- Le lien entre le facteur de croissance et le récepteur : la force de l'interaction peut dépasser celle du lien entre le facteur de croissance et le substrat, permettant l'endocytose du complexe.

2.2.2.3 Stratégies d'immobilisation de VEGF

Les stratégies d'immobilisation de VEGF reportées dans la littérature sont très variées (voir **Tableau 2-2**). Un grand nombre de stratégies d'immobilisation sont basées sur le **greffage covalent** de VEGF sur le substrat d'intérêt (Edlund, Sauter, & Albertsson, 2011; Miyagi et al., 2011; Porter, Alex M., Klinge, & Gobin, 2010; Sharon & Puleo, 2008; Taguchi et al., 2000). Afin de mimer un mécanisme matricrine, plusieurs groupes ont également employé des **composants de l'ECM** comme substrat pour le greffage covalent de VEGF, notamment l'héparine (Anderson et al., 2009), la fibronectine (Backer, Patel, Jehning, Claffey, & Backer, 2006) et le collagène (Chiu & Radisic, 2010; Shen, Y. H., Shoichet, & Radisic, 2008; Wang, A. Y. et al., 2008), ou sa version dénaturée, la gélatine (Ito, Hasuda, Terai, & Kitajima, 2005). Parmi les approches covalentes, l'on

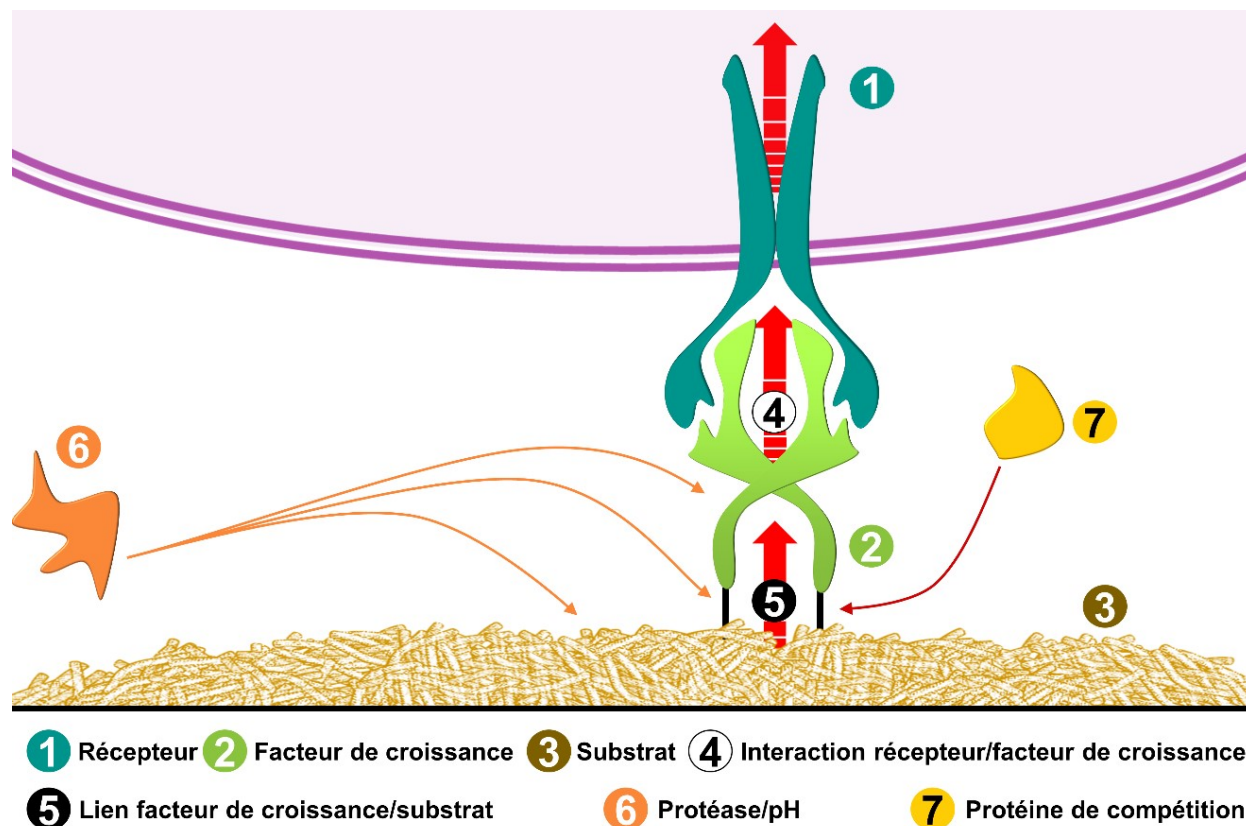


Figure 2-8 : Représentation schématique d'un facteur de croissance immobilisé et du stress environnemental.

Les flèches rouges indiquent le stress exercé sur la protéine : (1) la force d'internalisation cellulaire, (4) la force de l'interaction avec le récepteur et (5) la stabilité de la liaison avec le substrat.

notera la chimie carbodiimide sur des substrats porteurs de groupements amines ou carboxyles (Chiu & Radisic, 2010; Edlund et al., 2011; Miyagi et al., 2011; Shen, Y. H. et al., 2008; Taguchi et al., 2000), l'irradiation UV sur des substrats modifiés avec des groupements photo-réactifs (Anderson et al., 2009; Ito et al., 2005), ainsi que la chimie thiol par l'emploi d'une chimère de VEGF présentant une étiquette cystéine (Backer et al., 2006; Zisch et al., 2003).

Néanmoins, dans l'optique de préserver l'activité biologique de VEGF et/ou de permettre sa libération ou son endocytose, un nombre tout aussi important de stratégies ne reposent pas sur un greffage covalent (Anderson et al., 2009; Chung, Y. I. et al., 2010; Hutchings et al., 2003;

Lindhorst et al., 2010; Zieris et al., 2010). En conservant des composants de l'ECM dans leur design, ces approches pourraient **mimer avec justesse la membrane basale native**, et ce d'autant plus si l'immobilisation de VEGF est associée à des peptides d'adhésion et/ou d'autres facteurs de croissance tels que RGDS (Porter, Alex M. et al., 2010), ANG1 (Chiu & Radisic, 2010), PDGF (Richardson et al., 2001), TGF- β (Freeman & Cohen, 2009), HGF (Chapanian & Amsden, 2010), EGF (Assal, Mie, & Kobatake, 2013), ou encore FGF (Assal et al., 2013; Zieris et al., 2010).

La libération prolongée de VEGF est favorisée par une immobilisation non covalente du facteur de croissance sur le substrat, ce qui peut être réalisé via son affinité naturelle pour certains composants de l'ECM, par **interactions électrostatiques** (Crombez et al., 2005), par **adsorption** (Midy et al., 2001), ou encore par **encapsulation** (Chapanian & Amsden, 2010; Richardson et al., 2001). Ces techniques pourraient également **limiter la surstimulation** des cellules, dont les effets sont pour l'heure peu connus (Ozawa et al., 2004). Cependant, une capture de faible affinité pourrait ne pas fournir une **stimulation suffisante** pour assurer une angiogenèse efficace dans les structures pour le génie tissulaire ou la ré-endothélialisation complète de greffons vasculaires.

Ainsi, les stratégies impliquant une liaison à l'ECM miment la présentation native de VEGF, ce qui peut améliorer sa biodisponibilité. À l'opposé, les approches covalentes aléatoires peuvent procurer une grande stabilité au ligand, ce qui est d'un grand intérêt pour les applications mentionnées ci-avant, mais échouent souvent à promouvoir son orientation homogène. C'est pourquoi de nouvelles techniques permettant de contrôler à la fois stabilité et orientation sont requises.

Une voie attrayante à cette fin est basée les stratégies de **couplage à site spécifique**. Ces dernières nécessitent le plus souvent l'addition, par ingénierie des protéines, d'une étiquette au facteur de croissance : une étiquette polyhistidine pour la capture par chélation de cations métalliques reportée pour EGF (Nakaji-Hirabayashi et al., 2007), une étiquette contenant une étiquette cystéine pour la capture par chimie des thiols (Backer et al., 2006; Zisch et al., 2003), ou encore des séquences peptidiques permettant la capture par interaction superhélice (voir section 2.3) (Assal et al., 2013). Enfin, une méthode élégante basée sur l'oxydation des carbohydrates portés par VEGF a été présentée par Sharon et collègues pour le greffage covalent de la glycoprotéine sur un substrat porteur de groupements hydrazides (Sharon & Puleo, 2008).

Tableau 2-2 : Stratégies de greffage de VEGF à la surface de biomatériaux pour l'angiogenèse thérapeutique.

Référence	Stratégie de greffage ^a ■ covalente / @ par affinité / Ψ_z par adsorption (Substrat)-groupement groupement-(VEGF)	Orientation ^b	Densité ^c en ng.cm ⁻² (technique)	Modèle biologique ^d	Réponse étudiée ^e (technique)	Résultats notables concernant l'activité de VEGF - g/sVEGF : VEGF greffé/soluble - sVEGF : contrôle en absence de VEGF - <u>/!</u> : absence de contrôle adéquat sans VEGF
(Zhou, J. et al., 2016)	(Valve porcine+PEG)-acryloyle ■ SH-(hVEGF ₁₆₅)	?	n.d. (IF)	EPC	Adh. (compt., ADN) Prolif. (compt., ADN) Diff. (RT-PCR)	Pas d'effet gVEGF > sVEGF Exp. ARN(eNOS) et ARN(PA) similaires à celle d'HUVEC
(Xiong et al., 2016)	(Acier inox+PAAm)-quinone ■ NH ₂ -(VEGF)	✖	158 (QCM-D)	HUVEC	Adh./prolif. (WST)	gVEGF > sVEGF
(Koobatian et al., 2016)	(Sous-muqueuse intestinale)-Hep @ (hVEGF ₁₆₅)	✓	11 500 (dELISA)	Brebis (carotide)	Endo. (histologie, SEM)	Remodelage et endothélialisation complets <u>/!</u>
(Feito et al., 2016)	(Hydroxyapatite & Silicone) Ψ_z (hVEGF ₁₂₁)	?	2 200 (iELISA)	EPC	Prolif. (compt.)	gVEGF > sVEGF
(Melchiorri et al., 2015)	(PGLA ou PGA+PCLLA)-Hep @ (VEGF)	✓	n.d. (dELISA)	EPC, HUVEC EPC HUVEC HUVEC Souris (veine cave)	Prolif. (XTT) Diff. (RT-PCR) Diff. (RT-PCR) Diff. (RT-PCR) Endo. (histologie)	Pas d'effet Exp. ARN(VEGF) : gVEGF < sVEGF Exp. ARN(VEGF) : gVEGF > sVEGF Exp. ARN(eNOS) : gVEGF < sVEGF gVEGF > substrat nu <u>/!</u>
(Galas & Liu, 2014)	(TCPS) ■ nitrene-NHS ■ NH ₂ -(hVEGF)	✖	0,04 à 19 (dELISA)	HUVEC HMSC	Prolif. (WST) Diff. (IF)	Pas d'effet voire gVEGF < sVEGF
(Guex et al., 2014))	(PCL+COOH)-NH ₂ ■ COOH-(hVEGF ₁₆₅)	✖	700 (iELISA)	HUVEC iHUVEC	Prolif. (ADN) Prolif. (ADN) Morpho. (SEM)	Mort rapide dans toutes les conditions gVEGF ≤ sVEGF Monocouche pour gVEGF vs. tube pour sVEGF
(Wu, P., Fu, & Cai, 2014)	(Silicium+TESPSA)-COOH ■ NH ₂ -(hVEGF)	✖	gradient 54 à 132 (iELISA)	HUVEC	Morpho. (IF) Mig. (suivi caméra)	Orientation du cytosquelette selon le gradient Migration vers les fortes densités de VEGF
(Traub et al., 2013)	(PS+résine commerciale) Ψ_z (FN-hVEGF ₁₆₅)	?	n.d. (dELISA)	HUVEC	Adh. (violet) Morpho. (IF)	gVEGF > sVEGF Étalement : gVEGF > sVEGF
{Yang, 2013 #1132	(Acier inox+PAAm)-quinone ■ NH ₂ -(VEGF)	✖	76 (QCM-D)	EPC HUVEC	Adh. (IF) Prolif. (WST)	Pas d'effet
{Luo, 2013 #1133	(Acier inox+PDA)-quinone ■ NH ₂ -(VEGF)	✖	79 (QCM-D)	HUVEC	Adh. (compt., WST) Prolif. (compt., WST)	gVEGF > sVEGF
{Matsuda, 2013 #1253	(Verre+PEVA)-carbamate ■ NH ₂ -(hVEGF ₁₆₅)	✖	n.d.	EPC	Diff. (IF)	Exp. VEGF-R : gVEGF > anti-VEGF-R greffé <u>/!</u>

(Sasaki, Inoue, Katada, & Taguchi, 2012)	(Acier inox)-COOH ■ NH ₂ -(hVEGF ₁₆₅)	✖	12 (dELISA)	HUVEC	Prolif. (WST) Morpho. (IF)	gVEGF > sVEGF > VEGF Étalement : gVEGF > sVEGF ou VEGF
(Yang, Tu, Wang, & Huang, 2012)	(Acier inox+PAAm)-Hep @ (VEGF)	✓	60 (QCM-D)	HUVEC	Prolif. (WST) Mig. (IF)	Pas d'effet
(Kawahara & Matsuda, 2012)	(Verre+APTES)-NH ₂ ■ COOH-(hVEGF)	✖	n.d. (dELISA)	HUVEC	Adh. (micro.) Morpho. (micro., SEM)	Pas d'adhésion si cellules pré-incubées avec sVEGF Étalement : gVEGF > anti-VEGF-R2 greffé <u>/!</u>
				EPC, HUVEC	Résistance cisaillement (micro.)	gVEGF > anti-VEGF-R2 greffé <u>/!</u>
(Yu, M. et al., 2012)	(PS) Ψ _χ (Fc-hVEGF ₁₆₅)	✓	57 (iELISA)	HUVEC	Adh. (MTT) Prolif. (MTT) Morpho. (IF)	gVEGF-Fc > sVEGF ou autres protéines immobilisées gVEGF-Fc > sVEGF ou VEGF Fibres de stress : gVEGF-Fc = sVEGF-Fc > sVEGF
(Shin et al., 2012)	(PCLLA+PDA)-quinone ■ NH ₂ -(VEGF)	✖	20 à 200 (iELISA)	HUVEC	Morpho. (IF) Mig. (suivi caméra) Prolif. (ADN) Diff. (IF)	Étalement : pas d'effet Vitesse augmente avec densité de gVEGF gVEGF > VEGF Exp. CD31 : gVEGF > VEGF
(Hu, Neoh, Zhang, Kang, & Wang, 2012)	(Titane+HAC)-COOH ■ NH ₂ -(hVEGF)	✖	42 (iELISA)	EPC	Prolif. (MTT) Diff. (IF) Morpho. (micro.)	Hep+gVEGF > HAC+gVEGF > Hep > HAC Exp. vWF et CD31 : Hep+gVEGF > HAC+gVEGF > Hep > HAC Tubulogénèse : Hep+gVEGF > HAC+gVEGF > Hep = HAC
	(Titane)-Hep @ (hVEGF)	✓	45 (iELISA)			
(Poh, Shi, Lim, Neoh, & Wang, 2010)	(Titane+PDA)-quinone ■ NH ₂ -(hVEGF)	✖	26 (iELISA)	HDMEC HDMEC HMSC	Adh. (compt.) Prolif. (compt., MTT) Diff. (IF)	gVEGF > VEGF gVEGF > VEGF Exp. vWF et CD31 : PDA+gVEGF > titane <u>/!</u>
(Anderson et al., 2009)	(Verre+or)-Hep-azide @ ou ■ (hVEGF ₁₆₅)	✓	0,1 (dELISA)	HUVEC	Phospho VEGF-R2 (WB) Prolif. (micro.)	sVEGF > gVEGF covalent = gVEGF électrostatique > VEGF
(Zhou, M. et al., 2009)	(Artère décellularisée)-Hep @ (hVEGF ₁₆₅)	✓	13 (iELISA)	HUVEC Chien (carotide)	Prolif. (ADN) Endo. (histologie)	gVEGF > greffon nu <u>/!</u> gVEGF > greffon nu <u>/!</u>
{Sharon, 2008 #77}	(Verre+PGLA)-hydrazide ■ aldéhyde-(hVEGF ₁₆₅)*	✓	5 (μBCA)	BAEC	Prolif. (ADN)	sVEGF > gVEGF > VEGF
(Liu, L., Ratner, Sage, & Jiang, 2007)	(Verre+or)-COOH ■ NH ₂ -(hVEGF ₁₆₅)	✖	gradient n.d.	BAEC	Mig. (suivi caméra)	Migration seulement si gradient de VEGF
(Backer et al., 2006)	(Plaque à puits) Ψ _χ (FN)-NH ₂ ■ Cys-(hVEGF ₁₂₁)	?	2,5-250 (iWB)	HEK293/KDR PAE	Prolif. (MTS) Prolif. (MTS)	gFN-VEGF = FN + sVEGF > FN Pas d'effet de gFN-VEGF ou sVEGF
(Ito et al., 2005)	(PS) Ψ _χ (gélatine)-azide ■ NH ₂ -(hVEGF ₁₂₁)	✖	micropatron 0,03 à 2 (dELISA)	HUVEC	Prolif. (micro.)	Dose-dépendante : gVEGF-gélatine > VEGF
	(Verre) Ψ _χ (gélatine)-azide ■ NH ₂ -(hVEGF ₁₂₁)				Morpho. (micro.)	Alignement des cellules sur gVEGF-gélatine

Crombez (Crombez et al., 2005)	(PTFE+albumine)-NH ₂ Ψ _χ COOH-(hVEGF ₁₆₅)	✱	n.d. (dELISA)	HUVEC	Adh. (micro.) Mig. (micro.)	Pas d'effet voire VEGF > gVEGF gVEGF = sVEGF > PTFE nu <u>/!</u>
(Hutchings et al., 2003)	(Plaque à puits) Ψ _χ (hVEGF _{121, 165, 189})	✱	n.d.	HUAEC, BREC, FBAEC, HBMEC HUAEC, BREC	Adh. (violet) Mig. (suivi caméra)	g189 > g165 > g121 = VEGF FBAEC < autres lignées g189 > g165 <u>/!</u>
(Swanson, Hogrefe, Javed, & Gershlick, 2003) (Swanson, Hogrefe, Javed, Malik, et al., 2003)	(Acier inox+polymère commercial) Ψ _χ (hVEGF ₁₆₅)	✱	1 600 (radioact.)	HUVEC Lapins (angioplastie artère fémorale)	Prolif. (MTS) Endo. (histologie)	gVEGF = sVEGF > VEGF Moins de 10% de couverture endothéliale Pas d'effet sur l'hyperplasie Diminution thrombose vs. VEGF Resténose : gVEGF = VEGF
(Taguchi et al., 2000)	(PE+PAAc)-COOH Ψ _χ ou ■ NH ₂ -(hVEGF ₁₆₅)	✱	n.d.	HUVEC	Adh. (WST) Mig. (micro., WST) Prolif. (WST)	FN > gVEGF covalent+FN > gVEGF covalent > gVEGF adsorbé gVEGF covalent+FN > gVEGF covalent = FN gVEGF covalent+FN > FN > gVEGF covalent

^aStratégie – acronymes et abréviations : PE(G) : polyéthylène (glycol); PAAm : polyallylamine; Hep :héparine; PGLA : poly(acide glycolique-*co*-lactique); PGA : poly(acide glycolique); PCLLA : poly(caprolactone-*co*-acide lactique); PS :polystyrène; NHS : N-hydroxysuccinimide; PCL : poly(caprolactone); TESPSA : 3-triethoxysilylpropyl anhydride succinique; FN : fibronectine; PDA : polydopamine; PEVA : poly(ethylene-*co*-vinyl alcool); APTES : aminopropyltriethoxysilane; Fc : fragment cristallisable d'une immunoglobuline; HAC : acide hyaluronique; PTFE : polytétrafluoroéthène; PAAc : acide polyacrylique.

^bOrientation : indique si l'orientation de la protéine est contrôlée via un greffage sur un résidu/domaine spécifique de VEGF (✓), ou non (✱).

^cDensité – acronymes et abréviations : n.d. : non déterminé ou non rapporté; IF : détection par immunofluorescence; QCM-D : mesure de dissipation par microbalance à cristaux de quartz; d/iELISA : dosage immuno-enzymatique direct/indirect; μBCA : micro-dosage par acide bicinchonique; iWB : immunobuvardage de western indirect; radioact. : dosage par marquage radioactif.

^dModèle biologique – acronymes et abréviations : EP : cellules endothéliales progénitrices, (i)HUVEC : cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (immortalisées); HMSC : cellules souches mésenchymateuses humaines; HDMEC : cellules endothéliales microvasculaires dermales humaines; BAEC : cellules endothéliales d'aorte bovine; HEK293/KDR : lignée de cellules embryonnaires de rein humain transformées pour exprimer VEGF-R2; PAE : cellules endothéliales d'aorte porcine; HUAEC : cellules endothéliales d'artère ombilicale humaine; BREC : cellules endothéliales de rétine bovine; FBAEC : cellules endothéliales d'aorte de fœtus bovin; HBMEC : cellules endothéliales de moelle osseuse humaine.

^eRéponse étudiée – acronymes et abréviations : Adh. : adhésion; Mig. : migration; Prolif. : prolifération; Diff. : différenciation; Endo. : endothélialisation; Morpho. : morphologie; compt. : comptage cellulaire; micro. : microscopie optique en champ clair; ADN : dosage de l'incorporation d'ADN radiomarké; RT-PCR : dosage d'ARN par transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase; WST/MTT/XTT/MTS : divers sels de tétrazolium utilisés pour mesurer l'activité métabolique cellulaire; SEM : microscopie électronique à balayage; violet : coloration cellulaire par violet de gentiane.

*aldéhyde-(hVEGF₁₆₅) a été obtenu par traitement de la glycoprotéine au periodate : l'aldéhyde est porté par le glucide.

2.2.3 Endocytose et signalisation de VEGF

Tel que décrit précédemment (section 2.1.3.5), des avancées importantes dans la recherche fondamentale sur VEGF ont permis de décrire un nombre important de mécanismes régulant l'activation des voies de signalisation de VEGF-R2, en particulier sur l'internalisation de ce récepteur. Néanmoins, de nombreuses questions restent sans réponse (Simons et al., 2016). L'on s'intéressera dans cette section à l'une d'entre elles qui, bien que rarement abordée dans les études fondamentales, s'avère incontournable pour le bon développement de thérapies anti- et pro-angiogéniques : l'internalisation de VEGF. Une étude a récemment observé dans des rétines de souris que, lorsque VEGF-R2 est activé par VEGF *in vivo*, le complexe entier est internalisé (Nakayama et al., 2013). **La nécessité de l'internalisation de VEGF et l'influence du mode de présentation *in vivo* ou *in vitro* (en solution ou immobilisé sur l'ECM) restent cependant à élucider.**

2.2.3.1 Contrôle de l'endocytose de VEGF

L'énergie requise pour enlever une protéine transmembranaire d'une cellule est équivalente à une énergie de liaison de $293 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, ce qui est théoriquement suffisant pour rompre un pont disulfure. L'interaction VEGF/VEGF-R2 présente quant à elle une constante de dissociation estimée à 37-750 pM, équivalente à une énergie de $52\text{-}60 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Anderson, Shergill, et al., 2011). Si l'énergie de liaison entre VEGF et le substrat est supérieure à cette dernière, il est possible que VEGF-R2 soit internalisé sans déplacer VEGF de la surface. Tel que proposé à la section précédente, **Figure 2-8**, l'**endocytose de VEGF immobilisé** va dépendre de son affinité pour le substrat et pour le récepteur, et sera ainsi **déterminée par la stratégie employée pour son greffage**. Il apparaît ainsi crucial de déterminer les énergies de liaison de ces interactions.

Par l'emploi d'un couplage covalent, l'affinité du facteur de croissance est basculée vers le substrat, ce qui empêche son endocytose. À l'opposé, une capture par interactions électrostatiques conduira à l'internalisation du complexe VEGF/VEGF-R2, ce qui a été observé pour VEGF lié à l'héparine (Anderson et al., 2009). Ces observations sont en accord avec les affinités rapportées pour les interactions VEGF/VEGF-R2 et VEGF/ECM (**Figure 2-9**).

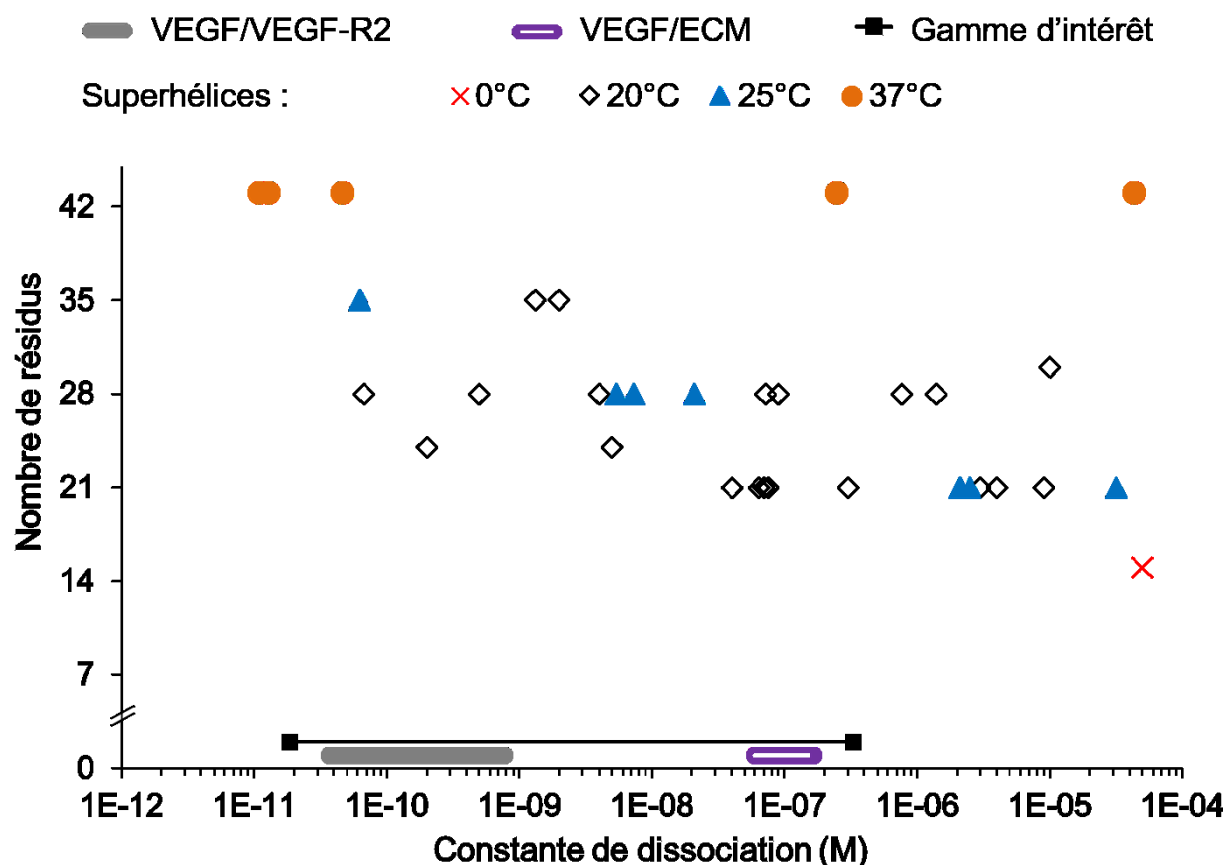


Figure 2-9 : Constantes de dissociation des interactions entre VEGF et ses partenaires biologiques, et des superhélices dimères rapportées dans la littérature.

Les valeurs des constantes de dissociation pour les interactions superhélices sont présentées selon le nombre de résidus du plus court peptide, dans le cas d'un couple aux longueurs inégales, et en fonction de la température employée lors de la mesure. Les valeurs sont tirées, ou calculées à partir de l'énergie libre ΔG suivant la formule $\Delta G = R \cdot T \cdot \ln(K_D)$, des références (Anderson, Chen, Iruela-Arispe, & Segura, 2009; Aronsson et al., 2015; Ashikari-Hada et al., 2004; Burkhard, Meier, & Lustig, 2000; Chao et al., 1996; Cochran et al., 2009; Cunningham et al., 1999; De Crescenzo, Litowski, Hodges, & O'Connor-McCourt, 2003; Fletcher et al., 2012; Krilleke et al., 2007; Litowski & Hodges, 2001, 2002; Moll, Ruvinov, Pastan, & Vinson, 2001; O'Shea, Lumb, & Kim, 1993; Quinn et al., 1993; Sawano et al., 1996; Terman et al., 1992; Thomas, Boyle, Burton, & Woolfson, 2013; Waltenberger et al., 1994).

2.2.3.2 Influence sur la réponse cellulaire

La grande majorité des études sur VEGF immobilisé emploient sa forme diffusible comme contrôle positif et/ou comparent les effets cellulaires obtenus en fonction de l'état soluble/immobilisé de la protéine. Une observation récurrente est la prolongation de la phosphorylation du récepteur lorsque VEGF est capturé sur un substrat. Il est souvent présumé, mais rarement démontré, que la phosphorylation prolongée du récepteur est due à une diminution de son endocytose. Cependant, la relation entre la présentation de VEGF et l'endocytose, l'activation et la signalisation de VEGF-R2 a commencé à être éclaircie grâce à quelques études récentes.

Chen et coll. ont comparé en détail les implications de VEGF diffusible et VEGF lié à l'ECM sur la signalisation (Chen, T. T. et al., 2010). Une forte agrégation de VEGF-R2 a été observée pour VEGF immobilisé, ainsi qu'une phosphorylation prolongée du résidu Y1214, et dans une moindre mesure du résidu Y951. La phosphorylation d'Y1214 a mené comme escompté à l'activation prolongée de la voie migratoire via les MAP kinases p38 (cf. **Figure 2-5.B**), en accord avec les études antérieures menées sur VEGF lié au collagène (Gerhardt et al., 2003). De façon surprenante, les auteurs ont observé une internalisation amplifiée et prolongée de VEGF-R2 lorsque VEGF était immobilisé, qui ne pouvait pas être expliquée par l'épuisement de VEGF lorsque présenté en solution. Il apparaît donc que c'est le mode de présentation de VEGF, davantage que sa stabilité, qui a une influence majeure sur la signalisation de VEGF-R2. On pourra également noter que l'endocytose de VEGF-R2 était requise pour sa phosphorylation.

Anderson et coll. ont similairement démontré qu'Y1214 était maintenu dans un état phosphorylé prolongé en présence de VEGF lié à l'héparine (Anderson et al., 2009). Par l'emploi d'un système élégant de photo-immobilisation, les auteurs ont pu comparer la signalisation de VEGF diffusible, VEGF lié électrostatiquement à l'héparine et VEGF couplé de manière covalente à l'héparine. Parmi ces trois approches, le couplage covalent a induit une phosphorylation amplifiée et prolongée des résidus Y1175 et Y1214 ainsi qu'une diminution du recyclage du récepteur. Bien que faible en comparaison à VEGF lié de manière électrostatique, un niveau non nul d'internalisation a également été observé pour le facteur de croissance lié de façon covalente, ce qui pourrait être expliqué par une photo-immobilisation incomplète ou une libération par clivage enzymatique. On notera que l'inhibition de l'endocytose de VEGF-R2 a diminué la

phosphorylation d'Y1175 pour les trois approches. Ces résultats confirment que l'internalisation de VEGF-R2 est requise pour sa phosphorylation, et suggèrent de plus que les deux sont possibles en l'absence d'internalisation de VEGF.

À l'opposé, Hu et coll. ont observé que VEGF lié de façon covalente à de l'acide hyaluronique était moins actif que VEGF lié de manière électrostatique à l'héparine (Hu et al., 2012). Les auteurs n'ont cependant pas étudié VEGF immobilisé par couplage covalent à l'héparine, et leurs résultats pourraient être expliqués autant par une différence d'internalisation que par des effets matricrines. En effet, l'étude menée par Chen et collègues a démontré que la signalisation accrue de VEGF-R2 en présence de VEGF immobilisé sur du collagène était associée à un recrutement d'intégrines $\beta 1$, pour lesquelles le collagène est un ligand naturel (Chen, T. T. et al., 2010; Humphries, Byron, & Humphries, 2006).

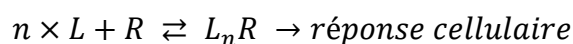
Ces diverses études ont commencé à lever le voile sur la relation entre l'endocytose de VEGF et la signalisation de VEGF-R2, et ont mis en évidence son importance quant à la sélection de la voie, l'amplitude et la durée de la signalisation. La **continuation des comparaisons entre diverses stratégies de greffage – notamment des approches à stabilité contrôlable** – pourrait *in fine* dévoiler les implications biologiques qu'apporte l'immobilisation de VEGF, et ainsi permettre son utilisation efficiente pour l'angiogenèse thérapeutique. Plus précisément, en considérant les forces s'appliquant au facteur de croissance immobilisé (présentées à la section 2.2.2.2) et les valeurs de K_D pour les interactions VEGF/VEGF-R2 et VEGF/ECM, une **gamme d'intérêt pour les valeurs de K_D entre le substrat et VEGF se dessine, entre 20 pM et 200 nM environ (voir Figure 2-9).**

Dans ce contexte, les stratégies de **greffage par affinité** présentent un attrait majeur. Basées sur l'interaction entre deux peptides ou protéines que l'on pourra nommer P1 et P2, elles impliquent la capture d'une protéine de fusion VEGF-P1 sur un substrat préalablement décoré avec le partenaire P2. La stabilité de VEGF sur le substrat peut alors être contrôlée par le biais de la force d'interaction entre des variants de P1 et/ou P2. Il faudra cependant s'assurer que les peptides/protéines P1 et P2 n'affectent pas l'activité de VEGF ni n'influencent le comportement des cellules endothéliales. Pour ce faire, il conviendra donc de mesurer la réponse cellulaire en fonction de la concentration du facteur de croissance natif et de la chimère. Les courbes dose-

réponse obtenues pourront alors être analysées à partir d'un modèle logistique à 4 paramètres, à partir duquel les concentrations efficaces médianes, EC50, pourront être comparées :

$$Y = Y_{min} + \frac{Y_{max} - Y_{min}}{1 + \left(\frac{X}{EC50}\right)^n}$$

Où Y est la réponse cellulaire mesurée en fonction de la concentration de (P1-)VEGF, X ; Y_{min} et Y_{max} sont les plateaux à réponse minimale et maximale, respectivement; n est le coefficient de Hill, qui représente en première approximation le nombre de sites d'interaction entre le ligand VEGF, L , et son récepteur, R , menant à la réponse cellulaire :



Ce modèle logistique est basé sur le concept classique que la réponse cellulaire résulte de l'interaction entre le ligand et son récepteur (qui peut être pré-dimérisé en l'absence de ligand), et donc que les courbes de dose-réponse obtenues reflètent la courbe de liaison du ligand sur le récepteur (Prinz, 2010). Bien que largement employé, ce modèle simple présente des limites d'interprétation, notamment lorsque le coefficient de Hill obtenu n'est pas un nombre entier et/ou lorsque l'interaction est allostérique. Il permettra néanmoins de déterminer si la protéine chimère présente une activité biologique comparable à celle de la protéine native.

Parmi les stratégies de greffage par affinité, l'on s'intéressera tout particulièrement à celles mettant en jeu des interactions dites superhélices – présentées dans la section 2.3 ci-dessous – car leur connaissance approfondie, appuyée par des décennies de recherche, a permis le développement de nombreux couples de peptides dont les affinités pourraient couvrir la gamme d'intérêt proposée (voir **Figure 2-9**).

Boîte 2-5 : Approches technologiques pour la présentation de VEGF et leurs implications : message à retenir

- Les paramètres clefs gouvernant l'activité biologique d'un facteur de croissance immobilisé sont sa densité, sa flexibilité, son orientation et sa stabilité.
- L'affinité du facteur de croissance pour le substrat présente un intérêt majeur, puisqu'elle influence la durée de phosphorylation et l'endocytose du récepteur.
- L'influence qu'a l'internalisation simultanée de VEGF sur l'activation et la sélection des voies de signalisation de VEGF-R2 demeure méconnue et peu étudiée. L'avancement des connaissances nécessite de comparer plusieurs stratégies de greffage, en particulier vis-à-vis de la stabilité du lien entre VEGF et le substrat.

2.3 Les interactions superhélices

Les protéines naturelles ne représentent qu'une infime fraction des enchainements possibles d'acides aminés. Il est possible qu'elles ne représentent aussi qu'une fraction des structures possibles, car celles trouvées dans les protéines semblent relativement limitées (Liu, X., Fan, & Wang, 2004). Une compréhension approfondie des relations entre séquence et structure pourrait ainsi permettre de créer de nouvelles structures aux applications inattendues (Woolfson, 2017). Ceci est l'une des raisons pour lesquelles la recherche est très active dans la **conception rationnelle de protéines**, que l'on peut découper en trois approches majeures :

- **La conception *de novo* de protéines** : construction de toutes nouvelles séquences par règles empiriques, raisonnement heuristique ou à l'aide d'ordinateurs analysant de larges bases de données;
- **La reconception de protéines** : mutation de séquences conçues *de novo* pour améliorer leurs propriétés;
- **L'ingénierie des protéines** : modifications limitées apportées à des séquences naturelles.

2.3.1 Généralités

L'hélice α est une structure secondaire fréquente chez les protéines, dont la découverte s'est faite et a été affinée par diffraction de rayons X entre les années 1930 et 1950 (Parry, Fraser, & Squire, 2008). Elle est caractérisée par l'arrangement hélicoïdal droit d'au moins 4 résidus consécutifs selon un pas de 3,6 résidus par tour et de 0,15 nm par résidu suivant l'axe. Les hélices à pas de rotation gauche existent mais sont très minoritaires dans les protéines. La structure est stabilisée par des interactions intramoléculaires : des **liaisons hydrogènes** $(C = O)_n / (H - N)_{n+4}$ dans le squelette de la protéine, entre un résidu en position n et un résidu en position $n + 4$ (**Figure 2-10.A**). **Les chaînes latérales des résidus sont orientées vers l'extérieur**, exposées au solvant et ainsi biodisponibles pour des interactions intra- ou intermoléculaires (**Figure 2-10.B**) (Lupas & Gruber, 2005). Les hélices α ont un rôle structurel majeur dans la conformation tridimensionnelle des protéines.

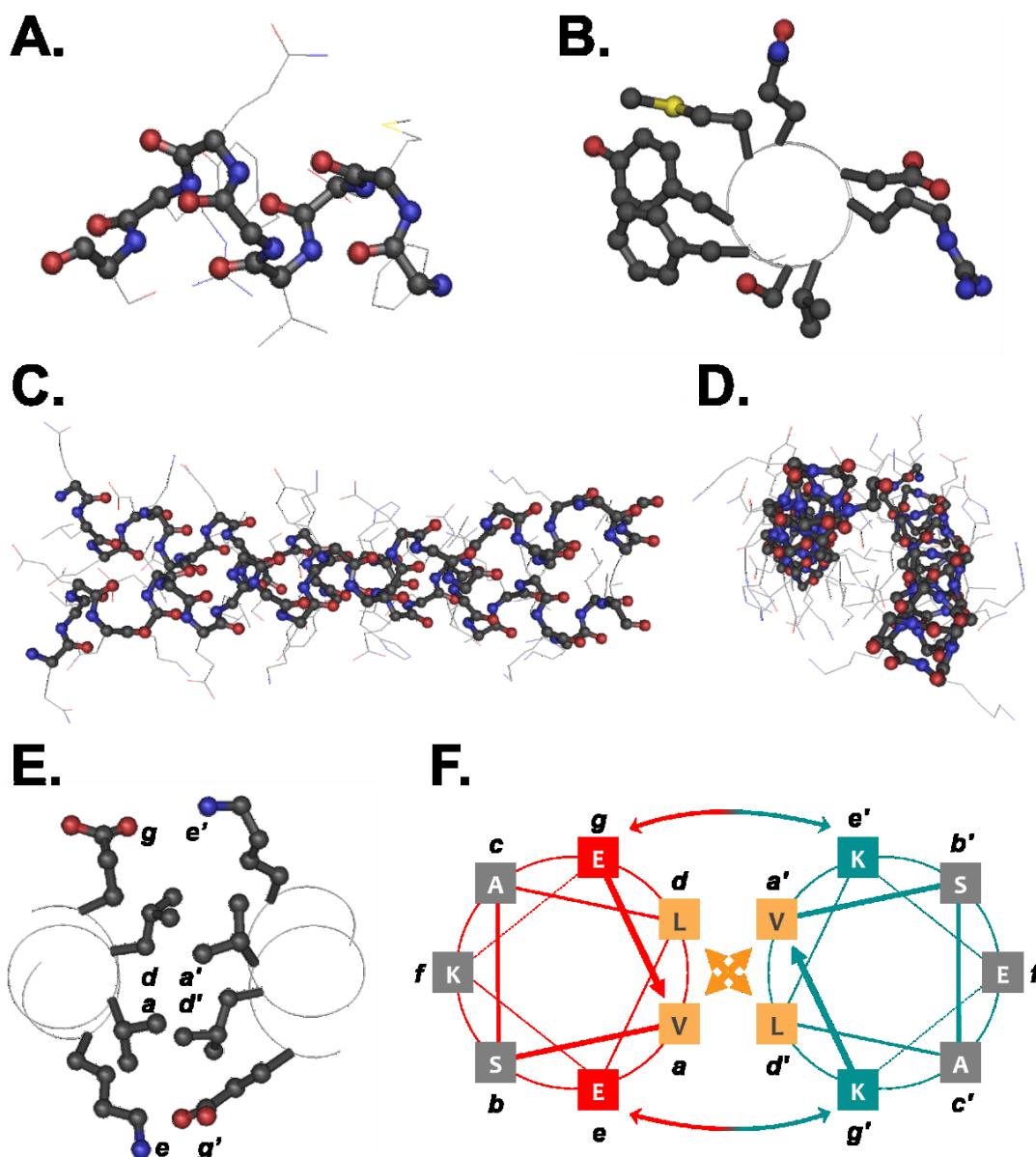


Figure 2-10 : Hélice α et superhélice dimère.

(A) Vue longitudinale et (B) vue transversale de l'hélice α N-terminale de VEGF₁₆₅. (C) Vue longitudinale et (D) vue transversale de la superhélice de la glissière à leucine GCN4. (E) Vue longitudinale d'une heptade homodimère de GCN4 : *gabcdf* = *EVARLKK*. Les atomes (A, C, D) du squelette seul ou (B, E) des chaînes latérales seules sont présentés. Figure produite avec le logiciel Cn3D à partir des données structurales de (Muller et al., 1997) et (O'Shea, Klemm, Kim, & Alber, 1991). (F) Représentation schématique d'une heptade hétérodimère du couple E5/K5 : *gabcdf/g'a'b'c'd'e'f'* = *EVSALEK/KVSALKE*, adaptée de (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003).

La première description d'un **motif hélicoïdal d'ordre supérieur** a été faite par Crick en 1953 (Parry et al., 2008). Ce motif, dit **superhélice** ou *coiled-coil*, est formé par deux hélices α , ou plus, qui s'enroulent les unes autour des autres suivant un pas d'environ 15 nm (**Figure 2-10.C-D**). L'enroulement peut être dans le sens gauche (le plus courant, qu'il s'agisse de superhélices dans des protéines natives ou des séquences conçues *de novo*) ou le sens droit. Les hélices impliquées dans ces superstructures ne sont pas alignées mais subissent une torsion d'environ 20°. Cette contrainte supplémentaire est à l'origine d'un changement du pas : diminution à 3,5 résidus par tour pour les superhélices gauches, et augmentation à 3,67 résidus par tour pour les superhélices droites (Parry et al., 2008). La formation des superhélices gauches et droites est par conséquent favorisée par une répétition logique d'acides aminés suivant une période de 7 ($3,5 \times 2$) ou 11 ($3,67 \times 3$) résidus, respectivement. Les structures sont stabilisées par des **interactions inter-hélices** qui mettent en jeu les chaînes latérales des résidus (voir section 2.3.2 ci-dessous) et influencent le parallélisme de la superhélice. L'empilement des chaînes latérales a été dénommé *knobs-into-holes*, ou bosse/bouton dans creux, par Crick, pour refléter le fait qu'une chaîne latérale d'une hélice « bosse/bouton » s'insèrent dans un « trou » formé par 4 chaînes latérales de l'hélice partenaire (**Figure 2-10.E**). Des interactions entre les chaînes latérales d'une hélice et le squelette d'une autre pourraient de plus stabiliser la structure (Tropsha, Bowen, Brown, & Kizer, 1991). Les superhélices ont plusieurs rôles fonctionnels importants, notamment pour la fusion avec la membrane cellulaire et la liaison à l'ADN.

2.3.2 Conception rationnelle : principes fondamentaux

Un grand nombre d'études a permis d'identifier les interactions influençant la stabilité des superhélices, et des protéines plus généralement, parmi lesquelles figurent la formation d'un cœur hydrophobe, les interactions électrostatiques et de van der Waals ainsi que les liaisons hydrogènes (Hodges et al., 2009). La séquence d'acides aminés confère de nombreuses propriétés aux superhélices : **le degré d'oligomérisation** (nombre d'hélices dans le motif), **la longueur** (environ 0.14 nm par résidu), **la direction** (parallèle ou antiparallèle), **l'homogénéité** (homo- ou hétéromères) et **la stabilité**.

Les **superhélices** gauches, dites **canoniques**, sont les plus documentées. Nous nous restreindrons pour la suite aux superhélices canoniques formées de deux hélices parallèles, mais on notera qu'un degré d'oligomérisation supérieur peut apparaître, ce pour diverses raisons (voir ci-dessous, section 2.3.3.1). La formation des superhélices est un mécanisme de repliement réversible qui permet d'aboutir à une conformation énergétiquement favorable. Comme pour la plupart des processus biologiques d'auto-assemblage, l'effet hydrophobe est sa force motrice. La structure présente ainsi un cœur où les résidus hydrophobes (*H*) sont enfouis et stabilisés par des forces de dispersion de London (dipôles induits) tandis que les résidus polaires (*P*) sont exposés au solvant aqueux avec lequel ils forment des liaisons hydrogènes (dipôles permanents). Alors qu'un patron alternatif de type *HPHP*... aura tendance à s'organiser en feuillets β , le patron général des hélices α est plus aléatoire et apparaît basé sur la présence de 2 à 3 *P* entre deux *H*. La formation de superhélices requiert une plus grande régularité, et les deux hélices qui la composent sont de façon prédominante composées d'une répétition d'**heptades** dont le patron est *HPPHPPP* (Woolfson, 2005).

En règle générale, pour une superhélice formée de deux hélices α dénotées *abcdefg* et *a'b'c'd'e'f'g'* (voir **Figure 2-10.E-F**) :

1. Les positions *a*, *a'*, *d* et *d'* sont occupées par des **résidus hydrophobes**, le plus souvent **aliphatiques** (alanine, isoleucine, leucine, méthionine et valine), dont le rôle structural est d'assurer la cohésion et la stabilité du complexe via des interactions hydrophobes *a/a'* et *d/d'* au sein d'une même heptade. Le cœur hydrophobe ainsi formé permet de minimiser les interactions entre le solvant polaire aqueux et les chaînes latérales apolaires. Les résidus hydrophobes aromatiques sont faiblement représentés à ces positions, sans doute par l'encombrement stérique qu'ils apportent;
2. Les positions *b*, *b'*, *c*, *c'*, *f* et *f'* sont le plus souvent occupées par des **résidus hydrophiles**, car ils sont exposés au solvant, et ayant une **forte propension hélicoïdale** (alanine, acide glutamique, lysine et glutamine);
3. Les positions *e*, *e'*, *g* et *g'* sont également occupées par des **résidus polaires** et présentent une **bonne propension hélicoïdale**. Pour la conception *de novo*, les **résidus ionisables**

acide glutamique et lysine, qui sont porteurs de charge dans une large gamme de pH ¹, sont souvent préférés. Ces derniers établissent des interactions électrostatiques e/g' et g/e' (g d'une heptade vers e' de l'heptade suivante) et contribuent ainsi à la stabilité du complexe. Leur rôle est également de contrôler la spécificité de l'interaction entre les deux hélices (homodimère vs. hétérodimère);

4. Un **minimum de 2 heptades** est nécessaire pour la formation stable d'une superhélice, tout du moins pour des peptides conçus *de novo* (Burkhard et al., 2000).

2.3.3 Leviers de contrôle

Depuis l'amorce faite par Hodges et collègues en 1981 avec un peptide basé sur l'heptade ***abcdfg* = LEALEGK** (Hodges, Saund, Chong, St-Pierre, & Reid, 1981), ces principes fondamentaux ont nourri pendant plus de 30 ans la **conception *de novo* de nombreuses superhélices** dont les propriétés sont très variées (Chao et al., 1996; O'Shea et al., 1993). Un approfondissement considérable de notre compréhension et l'avènement d'outils bioinformatiques puissants durant les 10 dernières années ont permis d'affiner ces principes (Woolfson, 2017) et d'alimenter la **reconception de superhélices** possédant la stabilité, la spécificité et le degré d'oligomérisation adéquats pour une application donnée (Aronsson et al., 2015; De Crescenzo, Litowski, et al., 2003; Fletcher et al., 2012; Pechar et al., 2014; Thomas et al., 2013).

2.3.3.1 Degré d'oligomérisation

Le **degré d'oligomérisation** (dimère, trimère ou tétramère pour la grande majorité des structures rapportées) est principalement régulé par les résidus en position ***a*** et ***d***. Diverses études basées sur l'ingénierie des protéines et la reconception *de novo* ont permis de mettre en évidence que, pour des raisons d'arrangement spatial des atomes (stéréochimie), la position ***a*** favorise les résidus ramifiés valine (***V***) et isoleucine (***I***), mais pas la position ***d*** qui préférera la leucine (***L***) (Harbury, Zhang, Kim, & Alber, 1993; Tripet, Wagschal, Lavigne, Mant, & Hodges, 2000;

¹La proportion des porteurs de charge – $\left(\frac{COO^-}{COO^- + COOH}\right)$ pour l'acide glutamique et l'acide aspartique, ou $\left(\frac{NH_3^+}{NH_3^+ + NH_2}\right)$ pour la lysine et l'asparagine – est supérieure à 50% pour des valeurs de pH entre 4,1 et 10,5.

Wagschal, Tripet, Lavigne, Mant, & Hodges, 1999). Le respect de cette règle ($ad = VL$ ou IL) favorise les dimères (cf. **Figure 2-10.F**). Son inversion complète ($ad = LV$ ou LI) déstabilise la structure et cause son ouverture, promouvant la formation de tétramères. Enfin, les arrangements intermédiaires ($ad = LL, VV, II, VI$, ou IV) forment le plus souvent des trimères et/ou des mélanges d'états, jusqu'aux heptamères (Woolfson, 2017). L'introduction de résidus apolaires aux positions b , c , ou f augmente la taille du cœur hydrophobe et facilite également la formation de multimères (Tripet et al., 2000; Wagschal et al., 1999). À l'inverse, l'introduction d'une liaison hydrogène dans le cœur hydrophobe (e.g. asparagine ou lysine aux positions a et d') apporte une contrainte importante au système et diminue le degré d'oligomérisation (ainsi que sa stabilité) (Gonzalez, Woolfson, & Alber, 1996; Thomas et al., 2013). On notera cependant l'éloignement du patron *HPPHPPP* et le risque associé d'induire la transition vers une structure de feuillet β , alors plus favorable énergétiquement (Robson Marsden & Kros, 2010). Pour la conception *de novo*, la déviation des principes énoncés ci-avant se doit donc d'être menée avec parcimonie, par exemple dans une seule heptade. Néanmoins, par le bon arrangement de résidus hydrophobes et électrostatiques à ces positions, il devient possible d'édifier des structures d'ordre supérieur intéressantes, telles que des fibres ou des hydrogels (Dong, Paramonov, & Hartgerink, 2008; Srinivasan & Kumar, 2012).

2.3.3.2 Spécificité

La spécificité de l'interaction, ou plus précisément la **spécificité de sélection du partenaire**, est quant à elle majoritairement contrôlée par les résidus aux positions e et g . Comme indiqué précédemment, le résidu d'une hélice en position g est en effet face au résidu en position e' de l'hélice partenaire (sur l'heptade suivante), et vice-versa. Afin de diriger l'assemblage vers un motif souhaité, les résidus lysine (K) et acide glutamique (E) peuvent être intégrés à ces positions pour induire soit la répulsion soit l'attraction électrostatique (Woolfson, 2005). Cette pratique, amorcée par O'Shea et collègues en 1993 pour le premier hétérodimère conçu *de novo* (O'Shea et al., 1993), est devenue très courante (cf. **Figure 2-10.F**). Prenons un exemple : l'on souhaite promouvoir l'association de deux peptides différents (hétérodimérisation). Pour entraver son homodimérisation, E pourra être placé aux positions e et g afin d'induire une répulsion électrostatique entre deux peptides similaires. Le peptide partenaire présentera quant à lui K en positions e' et g' , ce qui permettra la formation des ponts salins $e/g' = E/K$ et $e'/g = K/E$. À l'inverse

pour la formation d'homodimères, le choix se portera plutôt sur des porteurs de charges opposées aux positions *e* et *g*.

On notera cependant que, si les interactions électrostatiques complètent les interactions hydrophobes dans la stabilisation de la superhélice, la répulsion électrostatique peut, elle, être compensée par un cœur hydrophobe très stable (Litowski & Hodges, 2002). De la même manière, la proximité forcée de deux peptides identiques, par exemple par leur greffage sur un polymère (Gerling-Driessen et al., 2015), peut induire la formation de la superhélice malgré la répulsion. Ce phénomène a également été observé pour des peptides possédant une extension contenant une cystéine, pour lesquels la formation d'un pont disulfure force l'assemblage en superhélice (Litowski & Hodges, 2001).

Enfin, la spécificité de l'interaction peut également être renforcée par l'introduction d'un résidu polaire en position *a* ou *d*. En complément des interactions électrostatiques, ce type d'approche a permis un progrès majeur dans les dernières années quant au développement de **systèmes orthogonaux**. Il est ainsi possible de contrôler l'auto-assemblage de superhélices bien définies dans un mélange de nombreux peptides (Aronsson et al., 2015; Crooks, Baxter, Panek, Lubben, & Mason, 2016; Gradisar & Jerala, 2011; Reinke, Grant, & Keating, 2010; Thompson, Bashor, Lim, & Keating, 2012).

2.3.3.3 Stabilité

Le **contrôle cinétique et thermodynamique** de l'interaction est majoritairement assuré par le cœur hydrophobe (positions *a*, *a'*, *d* et *d'*). L'augmentation de l'**hydrophobicité** des résidus stabilise le motif. Typiquement, un résidu valine ou isoleucine apportera une plus grande stabilité que la leucine, elle-même plus que l'alanine – un compromis doit cependant être trouvé vis-à-vis de l'encombrement stérique des chaînes latérales (Woolfson, 2005). L'on peut en outre considérer l'insertion d'un acide aminé non naturel possédant une grande surface hydrophobe, tel que la trifluoroisoleucine, pour stabiliser la superhélice (Robson Marsden & Kros, 2010). La contribution de chaque acide aminé naturel a été étudiée par Tripet, Wagschal et collègues, au moyen de la substitution systématique de tous les acides aminés naturels en position *a* et *d*. d'un peptide modèle basé sur l'heptade **VGALEKE** (Tripet et al., 2000; Wagschal et al., 1999). La gamme de stabilité couverte entre l'analogue le plus stable et l'analogue le moins stable était de 6,6 kcal.mol⁻¹ (27,6 kJ.mol⁻¹) pour la position *a* et de 7,4 kcal.mol⁻¹ (30,9 kJ.mol⁻¹) pour la position *d*. Dans les deux

cas, c'est la glycine qui déstabilise le plus l'interaction superhélice – à l'exception de la proline qui entrave totalement la formation de la structure hélicoïdale. En complément du cœur hydrophobe, un renforcement des **ponts ioniques** (positions *e*, *e'*, *g* et *g'*) stabilise la structure, tout comme l'augmentation du **nombre d'heptades** (Woolfson, 2005). Ce sont les heptades centrales qui apportent la plus grande contribution, les heptades terminales étant « effilochées » à l'image d'une corde (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003; Zhou, N. E., Kay, & Hodges, 1992).

Un nombre important de séquences a été rapporté, et une très large gamme d'affinités est présentée dans la littérature (voir **Figure 2-9**). Parmi ces dernières, on s'intéressera tout particulièrement au couple de peptides (*gabcdef*=*EVSALEK*)₅ et (*g'a'b'c'd'e'f'*=*KVSALKE*)₅, ou E5 et K5, développé par l'équipe du professeur Hodges (**Figure 2-10.F**) (Chao et al., 1996). C'est en effet sur ce couple qu'un nombre important d'études a été mené quant à l'impact du nombre d'heptades, de substitutions de résidus, de l'addition d'un pont disulfure ou encore de la technique de caractérisation employée (Aronsson et al., 2015; Chao, H., Bautista, D. L., Litowski, J., Irvin, R. T., & Hodges, R. S., 1998; De Crescenzo, Litowski, et al., 2003; Litowski & Hodges, 2001, 2002). Le nombre d'heptades apparaît comme le paramètre permettant d'élargir le plus la gamme d'affinités, chaque nouvelle heptade apportant 3,84 kcal.mol⁻¹ (16,1 kJ.mol⁻¹) à l'interaction – soit des constantes de dissociation valant respectivement 32 μM, 21 nM et 63 pM pour E3/K3, E4/K4 et E5/K5 (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003). Le renforcement du cœur hydrophobe par des substitutions aux positions *a* et *b* permet quant à lui un contrôle plus fin : l'on dénote par exemple une augmentation d'énergie libre de 2,4 kcal.mol⁻¹ (10 kJ.mol⁻¹) entre (*V**A**ALEKE*)₃ et (*I**A**ALEKE*)₃, et de 2,8 kcal.mol⁻¹ (11,7 kJ.mol⁻¹) entre (*I**S**ALEKE*)₃ et (*I**A**ALEKE*)₃ (Litowski & Hodges, 2002).

Étant donné la multitude de séquences possibles, de nombreuses autres remarques pourraient être faites sur les relations entre séquence et structure – par exemple pour l'assemblage contrôlé d'hétéromultimères, de superhélices antiparallèles et de superhélices droites – pour lesquelles le lecteur est renvoyé à d'excellentes revues (Armstrong et al., 2009; Parry et al., 2008; Woolfson, 2005, 2017).

2.3.4 Applications

Déclenché par des interactions électrostatiques et hydrophobes, l'auto-assemblage des superhélices est largement influencé par de nombreux paramètres environnementaux, dont le pH, la température et la force ionique. Il en résulte une grande polyvalence des protéines possédant des domaines superhélices, et une diversité de fonctions biologiques. Entre autres rôles, l'on pourra mentionner la formation de filaments dynamiques dans le cytosquelette, la liaison à l'ADN pour les facteurs de transcription, la liaison aux membranes ou encore le transport et la fusion vésiculaires pour les protéines SNARE (Hartmann, 2017; Robson Marsden & Kros, 2010; Rose & Meier, 2004).

Plusieurs **applications médicales** des superhélices sont basées sur le **ciblage direct** de diverses protéines au moyen des motifs superhélices qu'elles présentent. Pour le diagnostic et le traitement du cancer, Sharma et collègues ont ainsi développé une série de séquences permettant la détection de la protéine tumorale APC (Sharma, Logan, King, White, & Alber, 1998), tandis que d'autres groupes se sont intéressés à inhiber la transcription de certains gènes par la liaison aux facteurs de transcription proto-oncogènes possédant des glissières à leucine (myc, bZIP...) (Jouaux, Timm, Arndt, & Exner, 2009; Kaplan, Reinke, & Keating, 2014; Thompson et al., 2012). Sur le même modèle, des résultats intéressants ont été obtenus quant à l'inhibition de l'entrée du coronavirus Sars par le ciblage des glycoprotéines à sa surface (Liu, I. J. et al., 2009).

D'un point de vue **biotechnologique**, l'emploi de superhélices conçues *de novo* présente de nombreux avantages pour la construction de systèmes fonctionnels, dont (i) un auto-assemblage rapide, de l'ordre de la milliseconde, (ii) un résultat prévisible, basé sur des relations structure-séquence bien connues, (iii) des parties interchangeables, pour l'introduction de fonctions biologiques variées et (iv) un accès relativement aisé à n'importe quelle séquence polypeptidique, que ce soit par synthèse chimique ou recombinaison génétique et production biologique (Bromley, Channon, Moutevelis, & Woolfson, 2008). Ces propriétés font des superhélices des motifs de base au fort potentiel pour la **biologie de synthèse**, un domaine biotechnologique concentré sur la compréhension de la nature et son mimétisme pour la création de nouveaux systèmes fonctionnels. Les applications des superhélices ici présentées le sont dans un ordre de complexité croissant : du simple motif à l'assemblage de plusieurs motifs, jusqu'aux systèmes tridimensionnels complexes.

L'unité superhélice a été employée comme **bras de liaison** pour la **purification** et la **biodétection** (immunobuvardage et biocapteur SPR) d'une protéine recombinante d'intérêt, par l'introduction d'une étiquette peptidique sur cette dernière et la capture du peptide complémentaire sur un substrat solide (Boucher, St-Laurent, Jolicoeur, Crescenzo, & Durocher, 2010; Boucher et al., 2008; Chao, H. et al., 1998). Elle porte en effet l'avantage d'être très polyvalente, permettant l'intégration de la détection, de la purification et de l'analyse de protéines via une seule plateforme. Elle est également fonctionnelle sur de larges gammes de pH et en présence d'agents de chélation contrairement au système par affinité le plus répandu : étiquette poly(histidine) et ions métalliques. Cette stratégie a également été mise à profit pour l'**immobilisation** stable et orientée de facteurs de croissance sur des polymères et des nanoparticules par les groupes de De Crescenzo et Kobatake (Assal et al., 2013; Boucher, Ruiz, et al., 2010; Fortier, De Crescenzo, & Durocher, 2013), tandis que Ferrari et collègues l'ont employée pour combiner deux protéines (Ferrari et al., 2012). Une extension a été proposée pour la fusion de vésicules, par l'emploi de peptides modifiés par l'ajout d'une queue hydrophobe (Rabe, Schwieger, Zope, Versluis, & Kros, 2014).

De nombreux groupes de recherche se sont penchés sur la construction bien définie d'assemblages supramoléculaires depuis 1997, dont les **fibres** ont été les premiers rapportés (Kojima, Kuriki, Yoshida, Yazaki, & Miura, 1997; Pandya et al., 2000). Plusieurs stratégies ont depuis permis de contrôler finement leur rapport diamètre/longueur, notamment (i) par l'introduction asymétrique de porteurs de charge (positions *e*, *e'*, *g* et *g'*) et de résidus asparagines (positions *a* et *a'*) pour former des hétérodimères présentant une heptade « flottante » à chaque extrémité qui permet de recruter le peptide suivant (Ryadnov, Ceyhan, Niemeyer, & Woolfson, 2003), (ii) par l'introduction aux extrémités N- et C-terminales de résidus porteurs de charges opposées, permettant l'assemblage électrostatique des superhélices (Xu et al., 2013), ou encore (iii) par l'introduction d'une étiquette polyhistidine N-terminale, qui permet l'auto-assemblage par chélation à l'ajout de cations métalliques divalents $\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (Gunasekar, Anjia, Matsui, & Montclare, 2012). Les qualités exceptionnelles des fibres obtenues, dont certaines présentent des propriétés mécaniques proches du kevlar, pourraient ainsi étendre leur champ d'applications à de nombreux autres domaines, tels que les vêtements et les emballages alimentaires, à condition que des jalons significatifs soient atteints dans le développement de systèmes performants de production et de purification (Fu, Guerette, & Miserez, 2015).

Grâce au développement de séquences orthogonales, et par l'addition de cystéines pour la formation de ponts disulfures, des dendrimères ont pu être développés. Cette avancée a ouvert la voie à des structures plus complexes qui n'étaient jusqu'alors atteignables que par l'utilisation d'acides (désoxy)ribonucléiques (Kocar et al., 2015). Parmi elles, des **structures nanométriques ouvertes** dont les arêtes sont des superhélices ont été rapportées : triangles, carrés, losanges ou encore tétraèdres (Boyle et al., 2012; Gradisar et al., 2013). Plusieurs constructions sphériques ont également été présentées, notamment des **nanoparticules** (Raman, Machaidze, Lustig, Aebi, & Burkhard, 2006) et des **cages** fermées dont le diamètre varie entre 15 et 80 nm (Fletcher et al., 2013; Patterson et al., 2014). Ces dernières pourraient être d'intérêt pour l'**encapsulation** de médicaments pour diverses applications biomédicales, et permettent une décoration à la surface externe pour la livraison ciblée, ou encore pour l'**ingénierie des proto-cellules**.

Sur la base de ces éléments de construction, une grande variété de matériaux bio-inspirés et biomimétiques ont vu le jour, en particulier de nombreux **hydrogels** qui présentent des propriétés intéressantes de sensibilité au pH ou à la température (Dasgupta, Mondal, & Das, 2013; Quinlan, Bromley, & Pohl, 2015). On notera qu'en addition à toutes ces structures formées uniquement de peptides *coil*, de nombreux **assemblages hybrides** ont été développés par l'association de superhélices avec des nanotubes de carbone, des nanoparticules d'or, des liposomes ou divers polymères (Conticello, Hughes, & Modlin, 2017; Robson Marsden & Kros, 2010).

Boîte 2-6 : Interactions superhélices : message à retenir

- Les interactions superhélices figurent parmi les structures les mieux connues.
- La conception de séquences *de novo* permet d'obtenir des structures prévisibles, en termes de degré d'oligomérisation, de spécificité et, dans une certaine mesure, de stabilité. Le couple (**EVSALEK**)₅ et (**KVSALKE**)₅, ou E5 et K5, a en particulier fait l'objet de nombreuses études.
- Ce contrôle et leur utilisation relativement aisée a motivé leur emploi dans de nombreuses applications biotechnologiques, dont l'immobilisation de protéines sur des substrats solides.

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL

3.1 Description

Au vu de la frontière des connaissances dessinée ci-avant, il apparaît clairement que le facteur de croissance endothélial vasculaire possède le potentiel de répondre aux défis de l'angiogenèse thérapeutique. Pour ce faire, un aspect-clef de la réussite semble lié au contrôle et à la modulation de son activité biologique. Le contrôle de la présentation de VEGF est en effet mené avec grande finesse dans le corps, et ce notamment au moyen de l'expression d'isoformes distinctes en réponse à des besoins spécifiques. Ces isoformes interagissent avec les divers composants de la matrice extracellulaire selon des cinétiques spécifiques. La concentration de VEGF et sa disponibilité en solution sont ainsi régulées pour favoriser la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Le présent projet de recherche vise donc à répondre à l'**hypothèse biologique** suivante :

La sélection des voies de signalisation activées par la liaison entre VEGF et VEGF-R2, et ainsi la réponse cellulaire, peuvent être modulées par la stratégie d'immobilisation employée, et notamment via la stabilité du facteur de croissance et sa capacité à être internalisé par les cellules endothéliales.

Afin de vérifier l'importance de la dynamique d'interactions entre facteurs de croissance et la matrice extracellulaire, il nous faut mettre au point un système permettant d'immobiliser VEGF et de réguler sa libération. Notre regard s'est porté sur l'isoforme prédominante, VEGF₁₆₅, et le système superhélice non-naturel Ecoil/Kcoil (EVSALEK)₅/(KVSALKE)₅, ou E5/K5. L'hypothèse biologique précédente se traduit alors par une **hypothèse technologique** :

Le système superhélice est suffisamment polyvalent et modulable pour permettre un contrôle adéquat de l'immobilisation, de la concentration et de la libération de VEGF₁₆₅.

3.2 Objectifs

Afin de valider ces hypothèses, trois pans majeurs du projet peuvent être dessinés. Dans un premier temps, il s'agit de **valider que le système superhélice permet d'immobiliser VEGF₁₆₅ sous une forme biologiquement active (objectif 1)**. Nous avons adopté à cette fin l'approche suivante :

- (i). Produire une protéine chimère, dénommée E5-VEGF, correspondant à VEGF₁₆₅ étiqueté avec le peptide E5;
- (ii). Vérifier l'activité de la chimère en solution : stimulation de cellules endothéliales (portion VEGF₁₆₅ de la protéine chimère) et capture sur un substrat solide par interaction superhélice (portion E5 de la protéine chimère);
- (iii). Vérifier l'activité de la chimère après immobilisation par interaction superhélice : stimulation de cellules endothéliales.

Dans un deuxième temps, il convient de **démontrer que le système superhélice est largement modulable, en termes d'affinité et de stabilité (objectif 2)**. Pour ce faire, nous avons adopté l'approche suivante :

- (iv). Concevoir et produire des variants du peptide K5;
- (v). Vérifier l'activité des variants : capture d'E5-VEGF sur un substrat solide par interaction superhélice;
- (vi). Vérifier que les variants confèrent à VEGF₁₆₅ immobilisé une gamme d'affinité et de stabilité dans le domaine déterminé ci-avant (K_d entre 20 pM et 200 nM, voir section 2.2.3.2) : mesure des paramètres cinétiques et thermodynamiques.

L'atteinte de tous ces objectifs permet la validation de l'hypothèse technologique et l'amorce de l'étude fondamentale pour valider l'hypothèse biologique. Ainsi, dans un troisième temps, il s'agit d'**examiner la réponse de cellules endothéliales en présence de VEGF₁₆₅ immobilisé par interaction superhélice (objectif 3)**. Pour ce faire, la méthode suivante a été déterminée :

- (vii). Concevoir un substrat neutre permettant l'immobilisation spécifique et contrôlée de VEGF₁₆₅ par interaction superhélice;

- (viii). Déterminer les paramètres optimaux de greffage permettant le contrôle de la concentration et de la présentation de VEGF₁₆₅;
- (ix). Étudier le comportement de cellules endothéliales en présence de VEGF₁₆₅ immobilisé par interaction superhélice : mesure de paramètres cellulaires macroscopiques et moléculaires en fonction de la concentration de VEGF₁₆₅ et des variants du peptide K5 employés pour l'immobilisation.

3.3 Organisation du document

Nous rapportons dans le Chapitre 4 la production et la caractérisation de la chimère E5-VEGF. L'étude, publiée dans le journal *Acta Biomaterialia* en juin 2013, a démontré que la chimère immobilisée promeut la survie de cellules endothéliales modèles (HUVEC) en conditions pro-apoptotiques, validant ainsi l'atteinte de l'**objectif 1** (sous-objectifs i, ii et iii).

De plus, un résultat majeur a été obtenu lors de ces travaux : VEGF₁₆₅ immobilisé par interaction superhélice a démontré une très grande stabilité, largement supérieure à celle obtenue précédemment pour E5 ou le facteur de croissance épidermique étiqueté E5 (E5-EGF). Cette observation, qui a été attribuée à un phénomène d'avidité causé par la présence de deux étiquettes E5 sur la chimère dimère, a permis d'éclairer la conception des variants du peptide K5. En effet, la constante de dissociation pour l'interaction K5/E5-VEGF a été alors estimée inférieure au picomolaire. Afin de couvrir la gamme adéquate d'affinités proposées dans la sous-section 2.2.3.2, la conception des variants du peptide K5 s'est donc orientée dans le sens de la déstabilisation du complexe, afin de faciliter ultimement l'internalisation et/ou la libération de VEGF₁₆₅. Cette réflexion, détaillée dans la sous-section 5.9.1 et menée en collaboration avec le Prof. Robert S. Hodges à l'Université du Colorado, a abouti à la production de trois nouveaux peptides dénommés K5_1, K5_2 et K5_3. Leur capacité à recruter E5-VEGF a notamment été démontrée à l'aide d'un biocapteur SPR, réalisant ainsi les sous-objectifs iv et v de ce projet.

Il convient de noter que l'étude alors menée a dépassé le cadre du présent projet de recherche, notamment par l'emploi d'autres objets présentant un intérêt pour le génie tissulaire et la médecine régénératrice, porteurs d'un nombre variable d'étiquettes E5 : la chimère monomère E5-EGF et des nanoparticules modèles. Par le biais de ce second paramètre, c.à.d. le nombre d'étiquettes E5 en plus du choix du variant du K5, une gamme d'affinités très large (0,1 pM à 300

nM) et dépassant la gamme requise pour ce projet (20 pM à 200 nM) a pu être obtenue, validant ainsi le sous-objectif vi et ainsi l'**objectif 2**. Les résultats obtenus lors de cette seconde étude ont été publiés dans le journal *Biomacromolecules* en janvier 2017 et sont présentés dans le Chapitre 5.

Dans le cadre des sous-objectifs vii et viii, nous avons testés de nombreux substrats polymériques afin de déterminer leur capacité à assurer une immobilisation spécifique et contrôlée de la chimère E5-VEGF tout en permettant une bonne adhésion cellulaire. Durant ces recherches menées en collaboration au sein de l'équipe du Prof. De Crescenzo, un substrat permettant l'atteinte de cet objectif a été identifié : il comprend un revêtement de dextrane présentant des propriétés dites *low-fouling* (i.e. entravant l'adsorption de protéines et l'adhésion cellulaire) sur lequel des peptides du type RGD favorisant l'adhésion cellulaire sont greffés (Noel, Hachem, Merhi, & De Crescenzo, 2015).

Les contrôles menés lors des expériences relatives aux sous-objectifs vii et viii ont conduit à une découverte fortuite : une tendance prononcée du peptide K5 et/ou de la protéine E5-VEGF à s'adsorber sur de nombreuses surfaces. Afin de tirer profit de ce qui paraissait être de prime abord une limitation de notre stratégie de greffage (du fait d'interactions non spécifiques), nous avons mené une étude pour déterminer si les étiquettes E5 ou K5 permettaient l'adsorption orientée des biomolécules chimères. Ces résultats, rapportés dans le Chapitre 6 de cette thèse, mettent en évidence le potentiel d'une telle approche, en particulier pour Ecoil-VEGF combiné à des surfaces aminées.

Enfin, les outils nécessaires et l'approche expérimentale pour l'atteinte du sous-objectif ix et ainsi de l'**objectif 3** – raffinée grâce au savoir-faire acquis lors de la réalisation des travaux scientifiques exposés – sont présentés dans Chapitre 7 de cette thèse.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : COILED-COIL-MEDIATED GRAFTING OF BIOACTIVE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR

Ce chapitre est dédié à l'[article](#) intitulé *Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor*, qui a été publié dans le journal *Acta Biomaterialia* en juin 2013 (volume 9, numéro 6, pages 6806-6813). Il adresse l'objectif 1 présenté ci-avant.

4.1 Résumé

Les facteurs de croissance chimériques révèlent un fort potentiel pour la fonctionnalisation de matrices pour le génie tissulaire et pour les applications de la médecine régénérative, ce qui pourrait faire d'eux une alternative primordiale à leurs homologues naturels. La construction de ces chimères doit permettre une production pouvant être facilement mise à l'échelle, tout en améliorant leur rétention au niveau du site d'action. C'est dans cette optique que nous présentons ici la synthèse d'une protéine chimère, E5-VEGF, formée par l'association du facteur de croissance endothélial vasculaire 165 et d'une étiquette peptidique dénommée E5. L'homodimère E5-VEGF a été produit avec succès dans des cellules mammifères et purifié par chromatographie d'affinité. Des essais *in vitro* par biocapteur à résonance plasmonique de surface et des tests de survie cellulaire ont confirmé la capacité d'E5-VEGF à se lier au domaine extracellulaire de ses récepteurs associés, lorsqu'en solution. La morphologie des cellules dans le test de survie ont de plus corroboré son action anti-apoptotique. La capacité de l'étiquette E5 à guider l'immobilisation surfacique d'E5-VEGF a, quant à elle, été validée en injectant la chimère sur une surface de biocapteur fonctionnalisée de façon covalente avec le peptide K5 (un peptide synthétique conçu pour interagir spécifiquement avec la fraction E5 de la chimère). La capture est apparue comme spécifique et d'une haute stabilité. Cette stratégie d'immobilisation a alors été appliquée à des surfaces de verre, et l'activité biologique de la chimère de VEGF après immobilisation vérifiée. Nos résultats ont ainsi démontré que VEGF a pu être immobilisé de façon stable au moyen d'interactions superhélices, sans nuire à son activité biologique, ce qui ouvre la voie à de nouvelles applications dans le domaine du génie tissulaire et de la médecine régénératrice.

4.2 Header

COILED-COIL-MEDIATED GRAFTING OF BIOACTIVE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR

Frederic Murschel,[†] Benoit Liberelle,[†] Gilles St-Laurent,[‡] Mario Jolicoeur,[†] Yves Durocher,[‡] and Gregory De Crescenzo^{,†}*

4.3 Author Affiliations

[†]Department of Chemical Engineering, Biomedical Science and Technology Research Group , Bio-P2 Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), Canada H3C 3A7.

[‡]Life Sciences | NRC Human Health Therapeutics Portfolio, Building Montreal-Royalmount, National Research Council Canada, Montreal (QC), Canada H4P 2R2.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: gregory.decrescenzo@polymtl.ca; Tel: (514) 340-4711 (#7428); Fax: (514) 340-2990

4.4 Abstract

Chimeric growth factors may represent a powerful alternative to their natural counterparts for the functionalization of tissue-engineered scaffolds and applications in regenerative medicine. Their rational design should provide a simple, readily scalable production strategy while improving retention at the site of action. In that endeavor, we here report the synthesis of a chimeric protein corresponding to human vascular endothelial growth factor 165 being N-terminally fused to an E5 peptide tag (E5-VEGF). E5-VEGF was successfully expressed as a homodimer in mammalian cells. Following affinity purification, in vitro surface plasmon resonance biosensing and cell

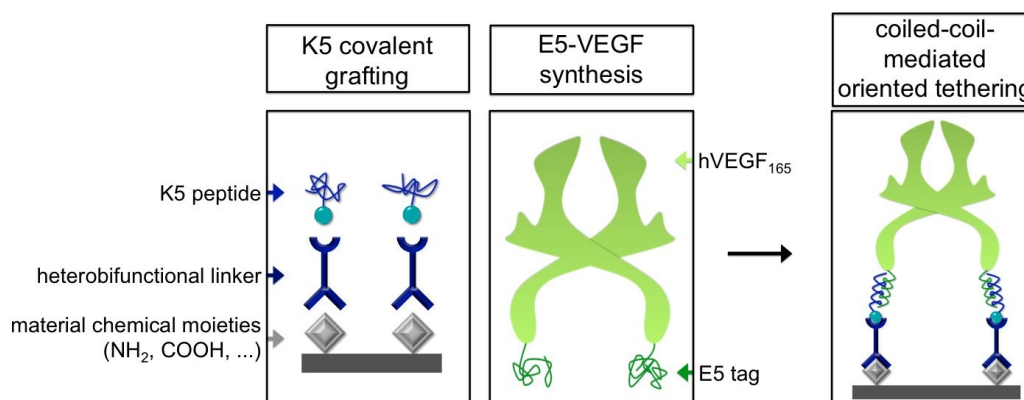


Figure 4-1 : Graphical abstract.

survival assays confirmed diffusible E5-VEGF ability to bind to its receptor ectodomains, while observed morphological phenotypes confirmed its anti-apoptotic features. Additional surface plasmon resonance assays highlighted that E5-VEGF could be specifically captured with high stability when interacting with covalently immobilized K5 peptide (a synthetic peptide designed to bind to the E5 moiety of chimeric hVEGF). This immobilization strategy was applied to glass substrates and chimeric hVEGF was shown to be maintained in a functionally active state following capture. Altogether, our data demonstrated that stable hVEGF capture can be performed via coiled-coil interactions without impacting hVEGF bioactivity, thus opening up the way to future applications in the field of tissue engineering and regenerative medicine.

4.5 Keywords

VEGF, E/K coiled-coil interactions, oriented immobilization, surface plasmon resonance, HUVE/HUVEC cell survival.

4.6 Introduction

Human vascular endothelial growth factor (hVEGF) belongs to a family of glycoproteins that has been discovered over two decades ago due to their ability to induce mitogenesis of vascular endothelial cells. Ever since then, several other biological roles have been unveiled for hVEGF, including monocyte chemotaxis, vascular permeabilization in inflammatory disorders, angiogenesis as well as vasculogenesis (Ferrara et al., 2003). These features make hVEGF an

interesting cytokine candidate for numerous regenerative medicine and tissue-engineering applications, such as endovascular stent grafts (Swanson, Hogrefe, Javed, Malik, et al., 2003; Van Belle, Tio, et al., 1997), patches for myocardial repair (Miyagi et al., 2011), biomimetic systems (Porter, A. M., Klinge, & Gobin, 2011) or vascularized scaffolds (Edlund et al., 2011; Lindhorst et al., 2010; Shen, Y. H. et al., 2008). To overcome hVEGF limited retention at sites of action and its short half-life in vivo (Lazarous et al., 1996; Moss et al., 2009), considerable efforts have been put forth to move from bolus hVEGF injections to stable functionalization of biomaterial surfaces and scaffolds (Edlund et al., 2011; Lindhorst et al., 2010; Porter, A. M. et al., 2011; Sharon & Puleo, 2008; Shen, Y. H. et al., 2008).

In that respect, the C-terminal heparin-binding domain of the high molecular weight isoforms of hVEGF was used to facilitate purification (Claffey et al., 1995; Myoken et al., 1991) and electrostatic tethering (Anderson et al., 2009; Chung, Y. I. et al., 2010). However, hVEGF undergoes plasmin digestion in serum and its N-terminal fragment, which harbors the receptor binding determinants, is cleaved (Houck et al., 1992). Not only does it lead to a loss in the local effective concentration of hVEGF, but also to potential undesirable effects remote from the site of capture (Houck et al., 1992; Keyt, Berleau, et al., 1996). Accordingly, chimeras bearing resistance to plasmin were synthesized (Lauer et al., 2002). Backer et al. also developed an elegant single-chain chimera of the 121 residue-long isoform of hVEGF, that exhibited a N-terminal cysteine-containing tag for thiol-mediated grafting (Backer et al., 2006). Although successful for hVEGF, the versatility of such an approach is questionable since the addition of a cysteine may negatively impact bioactivity due to wrong disulfide bridge formation during folding.

To address these limitations, we have developed a site-specific, stable and oriented growth factor immobilization method based on α -helical coiled-coil interactions (Boucher et al., 2009; De Crescenzo, Pham, Durocher, & O'Connor-McCourt, 2003). Our approach was motivated by decades of protein-protein interaction and protein stability studies (Hodges et al., 2009). The extensive knowledge of their features and roles has led to several applications, among which site-specific modification (Chen, Z., Popp, Bovet, & Ball, 2011) and stapling (Ferrari et al., 2012) of proteins for subsequent immobilization. In this study, 5-heptad-long E and K peptides from the VSAL family (Tripet et al., 1996), denoted E5 and K5 respectively, were employed. Each heptad repeat exhibits (i) hydrophobic residues, the packing of which is commonly referred to as “knobs-into-holes”, (ii) charged residues to promote heterodimerization, and (iii) residues with a high

helical propensity. The combination of these features leads to the spontaneous formation of left-handed α -helices aligned in a parallel manner. Most interestingly, the E5/K5 coiled-coil assembly is solely heterodimeric (Litowski & Hodges, 2001) and highly stable (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003). K5-derivatization of the substrate and E5-tagging of the protein of interest thus enables specific and oriented biomaterial functionalization (Boucher, Ruiz, et al., 2010).

Production of hVEGF chimeras, as well as wild-type hVEGF, has been reported in bacteria (Backer et al., 2006; Gerber et al., 1998), mammalian cells (Claffey et al., 1995; Lauer et al., 2002; Myoken et al., 1991) and silkworm larvae (Wu, X. F. et al., 2004). In order to avoid time-consuming downstream processing that bacteria and larvae require, and so as to enhance versatility, we developed a mammalian cell-based platform (Boucher et al., 2008; Durocher, Perret, & Kamen, 2002) that allows both rapid production of a fully mature form of E5-tagged hVEGF as well as purification not relying on heparin binding. Notably, fully bioactive E5-tagged epidermal growth factor (E5-EGF) and transforming growth factor-beta receptor ectodomains were readily produced in that platform, and were efficiently tethered on K5-derivatized substrates (Boucher et al., 2009; De Crescenzo, Pham, et al., 2003). We here report the production of E5-VEGF – an E5-tagged chimera of the predominant 165 residue-long isoform of hVEGF – and its tethering on cell-culture compatible glass substrates, as a model. We evaluated the bioavailability and bioactivity of our construct in a pro-apoptotic environment, representative of the immediate vicinity of aortic aneurysms and poorly vascularized scaffolds in vitro.

4.7 Methods

4.7.1 Chemicals and reagents

Amino-coated glass slides (1×1 cm) were obtained from Erie Scientific Co. (Portsmouth, NH). HUVE cells, EBM-2 medium and supplements (EGM-2 single quote kit containing growth factors, fetal bovine serum, ascorbic acid, heparin and hydrocortisone) were purchased from Lonza (Walkersville, MD). HUVE cells were cultured on 75-cm² CellBIND flasks and 24- or 96-well CellBIND plates from Corning (Corning, NY). F17 medium, L-Glutamine, geneticin (G418) and SYTOX Green nucleic acid stain were purchased from Invitrogen (Burlington, ON). The linear 25 kDa poly(ethylene imine) was obtained from Polysciences, Inc. (Warrington, PA). TN1 peptone

was obtained from Tekniscience Inc. (Terrebonne, QC). Phosphate buffered saline (10 mM PBS, pH 7.4), pluronic acid (F-68), anti-mouse-HRP conjugate and L-cysteine (99+% purity) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON). Cysteine-tagged K5 peptides were synthesized by the peptide facility at University of Colorado (Litowski & Hodges, 2001). MilliQ water was generated with a Millipore Gradient A 10 purification system. LC-SPDP (95+% purity) was purchased from Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL). CM5 sensor chips, HEPES buffered saline (HBS-EP), amine coupling kit (including 2-(2-pyridinyldithio)ethaneamine, PDEA), anti-(His)₆ mouse antibody as well as photosensitive films for Western Blots were obtained from GE Healthcare (Baie d'Urfe, QC). Proteins (KDR-Fc, Flt-1-Fc and hVEGF₁₆₅), anti-hVEGF₁₆₅ mouse antibody and hVEGF₁₆₅ ELISA kits were purchased from R&D systems (Minneapolis, MN). PVDF membranes and Precision Plus protein standards were purchased from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON). Formaldehyde was from ACP Chemical LTD (Whittle Parkway, United Kingdom). Cell proliferation reagent (WST-1 tetrazolium salt) was purchased from Roche Diagnostics (Laval, QC).

4.7.2 Cell culture

Cell culture was performed in a humidified incubator at 37°C with 5 % CO₂. A human embryonic kidney (HEK) 293 cell line, stably expressing the EBNA-1 protein, was maintained in shake flasks (120 rpm) in F17 medium supplemented with 4 mM L-glutamine, 25 µg/mL geneticin (G-418) and 0.1 % F-68 Pluronic (v/v). A primary human umbilical vein endothelial (HUVE) cell line was maintained in EBM-2 medium supplemented as recommended by the manufacturer (including 2 % fetal bovine serum, v/v), and used between passages 2 and 8.

4.7.3 Plasmid

pCX-VEGF was digested with EcoRI and BamHI; VEGF₁₆₅ cDNA was inserted into the pTT5 vector to obtain pTT5-VEGF. The pTT5-IL2SP-E5-(His)₈-EGF vector was digested by EcoRI, and the interleukin 2 signal peptide (IL2SP)-E5-(His)₈ sequence was cloned in frame with the pTT5-VEGF vector. The final product – pTT5-IL2SP-E5-(His)₈-VEGF – was confirmed by DNA sequencing.

4.7.4 E5-VEGF production and purification

Briefly, HEK cells were transiently transfected using 0.1 % plasmid (w/v) and 0.14 % 25 kDa linear poly(ethylene imine) (w/v), as previously described (Boucher et al., 2008). Cells were fed 24 hours post-transfection (hpt) with TN1 peptone (0.5 %, w/v) and the supernatant was harvested 120 hpt and 0.45- μ m filtered. Purification was performed on an ÄKTA Explorer Chromatography System, using 1-mL HisTrap FF crude and 5-mL HiTrap Desalting columns (GE Healthcare). E5-VEGF was 0.22 μ m-filtered, and protein yield was evaluated by ELISA, using commercial hVEGF₁₆₅ as standard.

4.7.5 SDS-PAGE and Western Blot analyses

HEK cell lysis was performed as previously described (Boucher et al., 2008). Equal amounts of each sample were mixed 3:1 with Laemmli sample buffer, supplemented with 5 % 2-mercaptoethanol (v/v) when indicated, and boiled for 5 min. 25 μ L of each sample were loaded on electrophoresis gels, concentrated at 100 V in 5 % poly(acrylamide) for 10 min then migrated at 200 V in 12 % poly(acrylamide) for 45 min. 10 μ L Protein standards were used as weight marker for each gel. Total protein content was revealed by Coomassie Blue R250 staining. For Western Blots, proteins were transferred to PVDF membranes under 80 mA for 1 h, at 4°C. The membranes were blocked with 5 % non-fat dry milk (w/v), probed with indicated antibodies for 1 h at 4°C, then incubated with an anti-mouse-HRP-conjugated antibody for 1 h. Detection was performed using ECL chemiluminescent substrate and photosensitive films.

4.7.6 Surface Plasmon Resonance-based assays

All experiments were performed at 25°C using HBS-EP as running buffer on a Biacore T100 biosensor, with CM5 sensorchips. Functionalization of the surfaces was performed at 10 μ L/min. Flt-1-Fc, KDR-Fc and PDEA linker were covalently immobilized using amine coupling on activated carboxymethylated dextran, as previously described (Boucher et al., 2009; De Crescenzo, Pham, et al., 2003; Liberelle et al., 2010). Remaining carboxyl moieties were inactivated by injecting 1 M ethanolamine. Cysteine-tagged K5 peptides were injected over PDEA-functionalized surfaces to allow their covalent and oriented tethering. Remaining thiol moieties were inactivated by injecting 50 μ M cysteine and 1 M NaCl in 100 mM acetate buffer, pH 4.0.

Mock surfaces were prepared according to the same protocol, but receptor-Fc and K5 injections were replaced by ethanolamine and cysteine injections, respectively. E5-VEGF was injected for 60 s at 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, followed by a 180-s dissociation phase. Sensorgrams were recorded and analyzed using the double-referencing technique (Rich & Myszka, 2000).

4.7.7 E5-VEGF immobilization on aminated glass surfaces

A K5 layer was first generated on amino-coated glass slides via a succinimidyl 6-(3-(2-pyridyldithio)propionamido)hexanoate (LC-SPDP) linker, by adapting previously reported procedure (Boucher et al., 2009). Briefly, the aminated glass surfaces (1×1 cm) were cleansed in an ultrasonic bath for 1 min in distilled chloroform and then dried in air at room temperature (RT). The aminated glass surfaces were covered with 150 μL of 2 mM LC-SPDP in 10 mM PBS (10% DMSO) for 15 min at RT. The surfaces were rinsed by soaking them in 10 mM PBS (pH 7.4) and in MilliQ-grade water. Thiol-reactive surfaces were then covered with 150 μL of 1 μM cysteine-tagged K5 peptides in 10 mM PBS for 1 h at RT. Unreacted thiol-reactive functionalities were blocked using 150 μL of 50 mM cysteine solution and 1 M NaCl in 100 mM acetate buffer, pH 4.0 followed by rinsing with MilliQ water. Glass surfaces harboring K5 peptides were eventually covered with 150 μL of 20 nM E5-VEGF for 1 h, and then rinsed by soaking in PBS. The surfaces were further washed in the cell-culture wells 3 times with 1 mL of PBS, prior to cell seeding.

4.7.8 Immobilized E5-VEGF quantification

Tethered growth factor quantitation was performed using a direct ELISA. The glass substrates were incubated in 100 μL of biotinylated anti-VEGF₁₆₅ antibodies during 1 h, then in 100 μL of horseradish peroxidase (HRP)-streptavidin conjugate for 1 h. The surfaces were revealed using 100 μL of substrate solution with 10 % Tween-20 (v/v). A calibration curve was performed in standard ELISA, and absorbance was read at 450 nm (and at 530 nm as a reference) on a Victor³ V Multilabel Counter from PerkinElmer Inc. (Woodbridge, ON).

4.7.9 Bioactivity assays

4.7.9.1 Cell seeding and serum-starvation

For diffusible E5-VEGF bioactivity assays, HUVE cells were cultured in 96-well plates until 80 % confluence was reached. Wells were then washed 3 times with 100 μ L sterile PBS, prior to incubation in 50 μ L of basal medium supplemented with VEGF₁₆₅, or E5-VEGF, as indicated. For tethered E5-VEGF bioactivity assays, HUVE cells were seeded in 24-well plates onto the glass surfaces, in 500 μ L of medium. The seeding corresponded to 20,000 and 40,000 cells/cm² for K5-derivatized and BSA blocked-surfaces, respectively. After a 4-h adhesion period, cells were washed 3 times with 500 μ L of sterile PBS and incubated in basal medium, supplemented with 1.5 nM soluble commercial hVEGF₁₆₅ when indicated. The cells were either fixed and counted or probed for metabolic activity after 48 h.

4.7.9.2 Metabolic activity assays

5 μ L of WST-1 reagent was added to each well, and its degradation was assessed every 30 min during 4 h, by absorbance reading at 450 nm (and at 630 nm as a reference). The mean slopes (absorbance units per minute, normalized) were used to evaluate metabolic activity.

4.7.9.3 Cell counting

Wells were washed 3 times with 100 μ L of PBS, and fixed for 30 min in 100 μ L of formaldehyde (3.7 % in PBS, v/v). Wells were washed again with PBS and nucleic acids were stained for 30 min with 100 μ L of SYTOX Green (0.01 % in PBS, v/v). Non-specific staining was removed by washing the cells twice with 100 μ L of PBS, for 10 min each, and salt residues were removed by washing with 100 μ L of MilliQ-grade water. Pictures of the air-dried wells/surfaces were taken under a 480-nm excitation using an AX10 Imager from Carl Zeiss Microscopy (Peabody, MA). Using ImageJ open source software, the total well surfaces were reconstructed and cells were automatically counted using particle analysis. Glass surfaces underwent the exact same procedure, with 500 μ L of reagent at each step instead of 100 μ L.

4.7.10 Data treatment

All data are represented as the mean value \pm standard deviation ($n \geq 3$). Standard deviation (SD) of ratios was calculated according to Equation 1.

$$SD\left(\frac{a}{b}\right) = \frac{a}{b} \times \sqrt{\left(\frac{a}{SD(a)}\right)^2 + \left(\frac{b}{SD(b)}\right)^2} \quad (1)$$

Dose-response data were fitted to Equation 2 using non-linear regression (nlinfit) in Matlab, on *Hill* and *EC50* parameters.

$$Y = \min(y) + \frac{\max(y) - \min(y)}{1 + \left(\frac{VEGF \text{ concentration}}{EC50}\right)^{Hill}} \quad (2)$$

Statistical analysis was performed by independent two-sample *t* test with equal variances.

4.8 Results

4.8.1 Motivation of the work

We have recently developed a coiled-coil based strategy that enables specific tailoring of biomaterials with growth factors (Boucher et al., 2009). In our approach, the substrate is derivatized with the K5 peptide via chemical modifications while we capitalize on an optimized expression platform for the rapid and scalable production of chimeric growth factor bearing the complementary E5 tag. In this study, we focused on addressing the lack of vascularization encountered in tissue engineering scaffolds and vascular prostheses. The field is indeed at a decisive milestone, with the worldwide positioning of cardiovascular diseases as the primary cause of death (Mathers & Loncar, 2006) and the pressing need to overcome long-term revascularization issues (Stone et al., 2007). In that endeavor, we designed an E5-tagged chimera of hVEGF₁₆₅ and sought to immobilize it via coiled-coil interactions.

4.8.2 E5-VEGF production and purification

E5-VEGF production and purification were assessed in SDS-PAGE and Western Blot assays (**Figure 4-2**); for each step of the process, protein quantitation was performed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Under reducing conditions (**Figure 4-2.b-c**), the molecular weight of the affinity-purified product was approximately 30-35 kDa; this value is consistent with E5-(His)₈-tagged hVEGF₁₆₅ (25.9 kDa) bearing an estimated 4.5-kDa N-linked glycosylation chain (Claffey et al., 1995). The corresponding band was barely detected in cell lysate (left column, **Figure 4-2.b-c-d**), confirming major secretion in culture supernatant. Accordingly, ELISA performed on conditioned medium reported high expression levels: 15.3 ± 5.6 mg/L over 5 independent 500-mL productions. Protein recovery after IMAC purification was evaluated at 35.4 ± 8.3 %, in good agreement with yields obtained for coil-tagged EGF and (His)₈-tagged VEGF with the same platform (Boucher et al., 2008; Cass, Pham, Kamen, & Durocher, 2005). Altogether, rational design of the plasmid construct (**Figure 4-2.a**), transient transfection of HEK293-6E cells and subsequent IMAC/SEC purification proved to lead to high yields of glycosylated and secreted E5-VEGF. The samples were further probed for E5-VEGF with an anti-hVEGF₁₆₅ antibody under non-reducing conditions (**Figure 4-2.d**): the 70-kDa-centered band highly suggested that E5-VEGF efficiently formed homodimers through disulfide bonds. Of prime interest, post-translational dimerization was reported to be critical for hVEGF₁₆₅ interactions with its main cellular receptors – fms-like tyrosine kinase (Flt-1) and kinase insert domain receptor (KDR) – (Potgens et al., 1994), and thus for its mitogenic potency (Claffey et al., 1995).

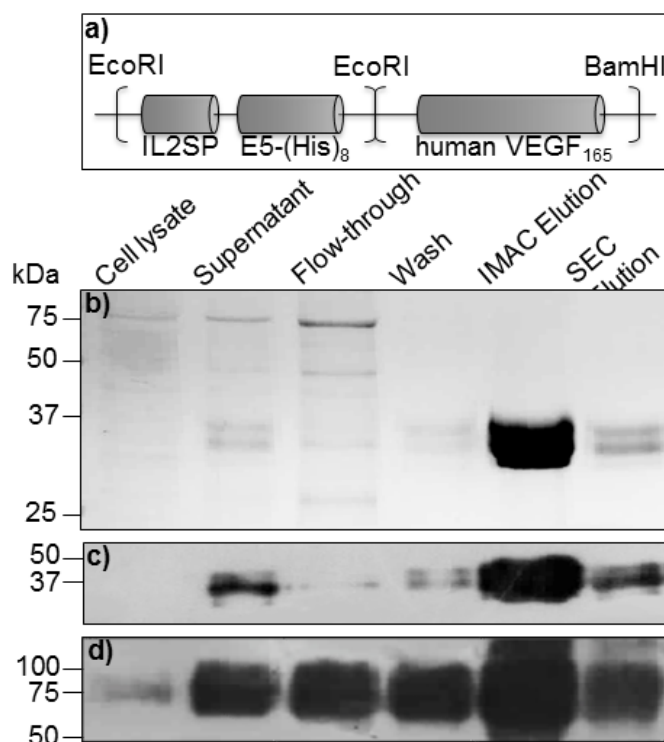


Figure 4-2 : E5-VEGF production and purification.

(a) pTT5 expression plasmid for the production of E5-tagged hVEGF₁₆₅. (b–d) SDS–PAGE analysis of E5-VEGF production and purification in (b and c) reducing or (d) non-reducing conditions, after (b) Coomassie Blue staining, or transfer to PVDF membranes and probing with (c) anti-(His)₆ or (d) anti-VEGF₁₆₅ antibodies.

4.8.3 E5-VEGF binding to its receptor ectodomains assessed in Surface Plasmon Resonance (SPR)-based assays

The ectodomains of Flt-1 and KDR being artificially dimerized through the Fc portion of an antibody, namely, Flt-1-Fc and KDR-Fc, were covalently immobilized via their amino groups in a non-oriented fashion onto distinct biosensor surfaces. 270 response units (RU) of 200-kDa Flt-1-Fc and 250 RU of 220-kDa KDR-Fc were obtained, which indicated that the surface densities of grafted ectodomains were comparable (difference lower than 20 %). Six successive E5-VEGF injections, with concentrations increasing from 32 pM to 100 nM, were then performed onto

ectodomain-functionalized and mock surfaces (**Figure 4-3**). Specific E5-VEGF binding to Flt-1-Fc and KDR-Fc was detected at concentrations as low as 32 and 160 pM, respectively, and resulted in a net accumulation of 52 and 19 RU of protein, highly suggesting that the E5-VEGF/Flt-1-Fc interactions were stronger than the E5-VEGF/KDR-Fc interactions. Notwithstanding, both complexes appeared to be quite stable during buffer injections in good agreement with reported dissociation constants of the native complexes, i.e. hVEGF₁₆₅/Flt-1 and hVEGF₁₆₅/KDR (Ferrara & Davis-Smyth, 1997). It is here noteworthy that VEGF₁₆₅ interacts with Flt-1 and KDR extracellular domains as it should with the full-length membrane-bound receptors (Kendall & Thomas, 1993; Shinkai et al., 1998). Our construct was further tested in its soluble form in in vitro cellular assays.

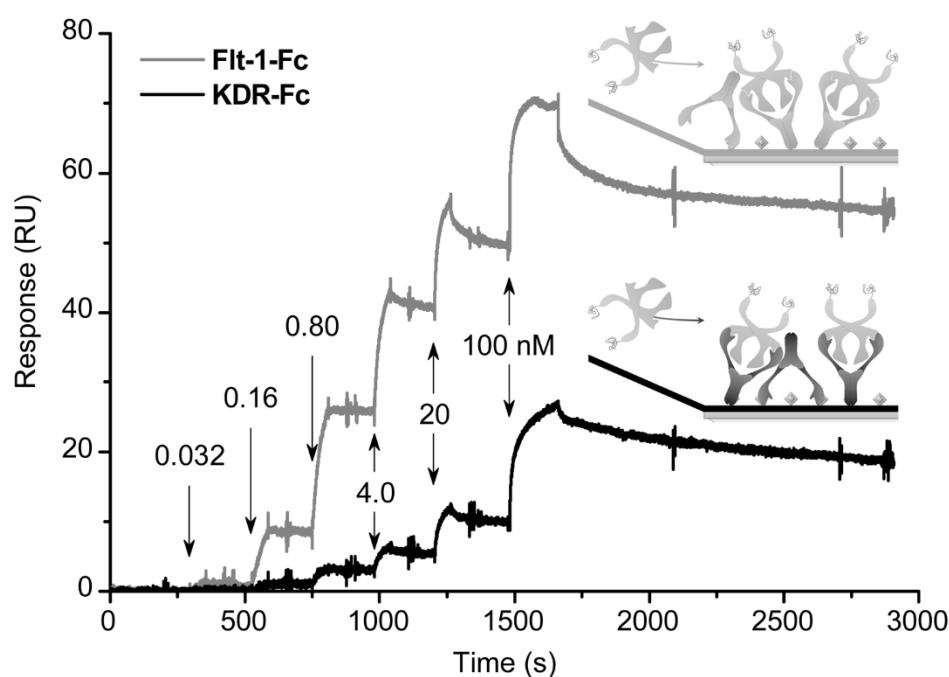


Figure 4-3 : SPR biosensor-based assay: E5-VEGF injections over immobilized hVEGF₁₆₅ receptor ectodomains, Flt-1-Fc and KDR-Fc.

Control-corrected sensorgrams are shown, with the signal from mock surfaces subtracted.

4.8.4 Concentration-dependence of soluble E5-VEGF bioactivity in serum-free conditions

Primary HUVE cells were exposed to E5-VEGF concentrations ranging from 15 pM to 15 nM, in serum-free medium to demonstrate protein activity. Photographs of a representative area were taken 24 and 48 hours later; special care was paid to capturing the exact same area within the well for both pictures (Figure 4-4). In the 0 to 470 pM E5-VEGF range (Figure 4-4.a-f), cell shrinking and disintegration into small vesicles was observed at 24 h, as well as an important decrease in cell number between 24 and 48 h. This phenotype was typical of cells undergoing late stages of apoptosis, the latter being induced by serum starvation (Gerber et al., 1998). In stark contrast, cells exposed to 3.75 nM E5-VEGF (Figure 4-4.g-h) demonstrated very few apoptotic bodies after 24 h; a little shrinking and detachment were observed after 48 h, but many contacts were kept between neighboring cells. E5-VEGF was thus shown to promote HUVE cell survival in a concentration-dependent manner, in good agreement with the antiapoptotic features of the native cytokine, which were demonstrated on HUVE cells exposed to 2.5 nM diffusible hVEGF₁₆₅ (Gerber et al., 1998).

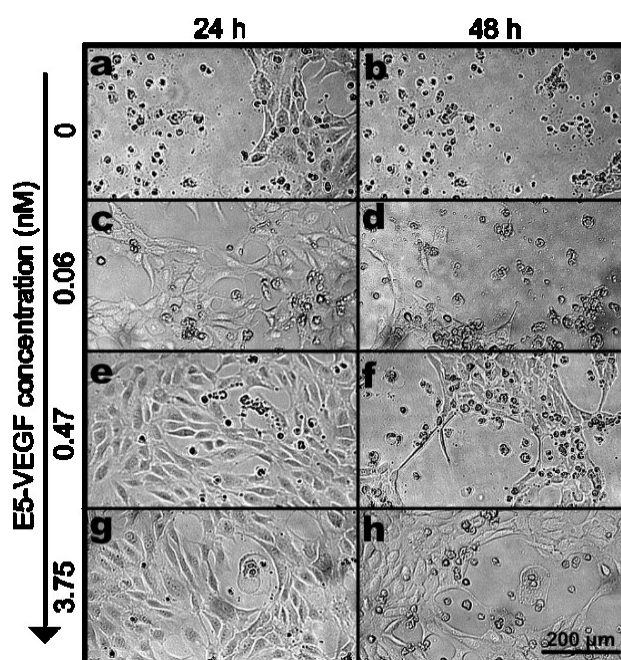


Figure 4-4 : Morphological analysis of HUVE cell survival in E5-VEGF-supplemented serum-free medium.

A closer examination was carried out at 48 h: remaining alive cells were either (i) fixed in the wells and stained with a fluorescent marker or (ii) probed for metabolic activity (MA) (**Figure 4-5**). When fixed (i), photographic reconstruction of the total well surface was performed by fluorescence microscopy, so as to count all the cells within the well via a particle analysis. The normalized cell counts indicated a dose-response mediation of cell survival by E5-VEGF, with a half-maximally effective concentration (EC₅₀) of 0.47 nM (**Figure 4-5**). This value is based on the premise that only live cells would be adhered and would consequently be fixed. Of interest, the apoptotic cells survived in clusters, and the more E5-VEGF, the more contacts the clusters shared with one another (see pictures, **Figure 4-5**). The photographs thus highlighted a macroscopic organization consistent with previous close-up pictures (**Figure 4-4**). For MA (ii), the normalized values followed a sigmoid-like trend similar to cell count values, (EC₅₀ = 0.39 nM, **Figure 4-5**). Similar experiments were conducted with commercially available untagged hVEGF165: the EC₅₀ values obtained by cell counting and by MA assay were 0.60 and 0.70 nM, respectively (data not shown). Altogether, the assays performed in pro-apoptotic conditions with soluble cytokines revealed no significant difference between our chimera and its untagged counterpart in inducing HUVE cell survival. The data were also in good agreement with reported EC₅₀ values for

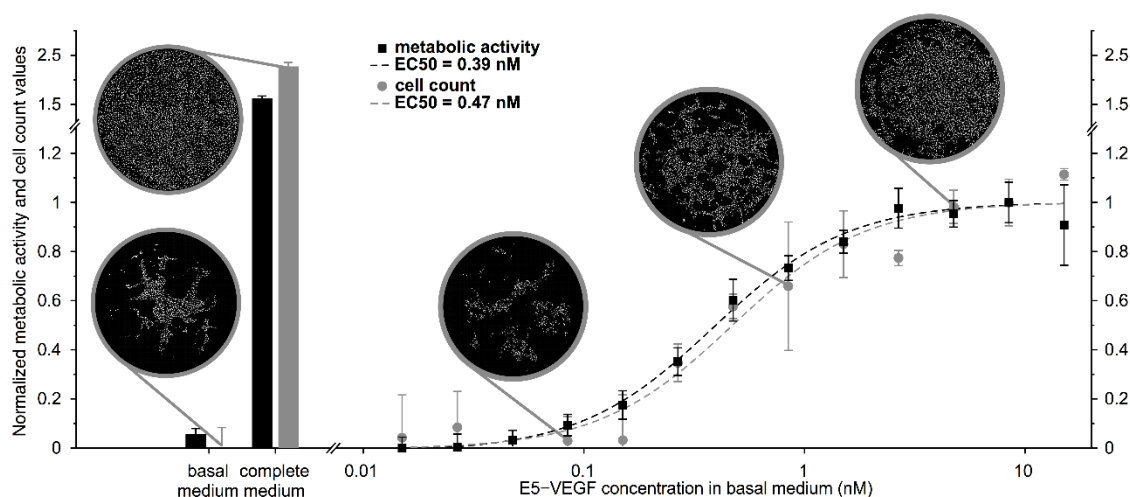


Figure 4-5 : HUVE cells metabolic activity measurements and cell counting, after 48 h in E5-VEGF-supplemented serum-free medium.

The data were independently normalized for each subset, and values are given as mean value \pm standard deviation ($n \geq 3$).

hVEGF₁₆₅-induced HUVE cell proliferation, as well as for human aortic endothelial cell migration (0.30 and 0.40 nM, respectively) (Dolle, Rezvan, Allen, Lazarovici, & Lelkes, 2005; Wang, Y., Fei, Vanderlaan, & Song, 2004).

4.8.5 E5-VEGF capture on surfaces decorated with K5 peptides assessed in SPR experiments

A layer of K5 peptides was created on a biosensor chip using PDEA as linking agent between the surface carboxylic groups and the cysteine-terminated K5 peptides. Six increasing E5-VEGF concentrations ranging from 6.4 pM to 20 nM were then injected over the K5-functionalized and the corresponding mock (cysteine-blocked PDEA) surfaces (**Figure 4-6**). As can be seen on control-corrected sensorgrams, the specific response increased after E5-VEGF injections (60 s each) and remained stable during buffer injections (180 s each), confirming that coiled-coil interactions promoted specific and stable capture of E5-tagged hVEGF₁₆₅ by immobilized K5 peptides. Interestingly, no decrease in the resonance response was observed even after a final 20-minute long buffer injection. This remarkable stability highly suggested a kinetic dissociation rate constant being extremely low, in turn translating into a thermodynamic dissociation constant in the low picomolar range. Moreover, as opposed to the E5/K5, E5-EGF/K5 and TβRIIED-E5/K5

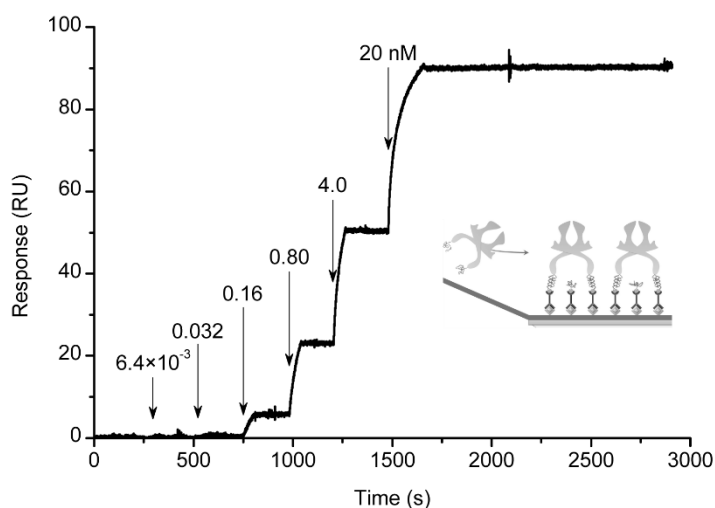


Figure 4-6 : SPR biosensor-based assay: E5-VEGF injections over immobilized K5.

The control-corrected sensorgram is presented, with the signal from the mock surface subtracted.

heterodimerized motifs (Boucher et al., 2009; De Crescenzo, Litowski, et al., 2003; De Crescenzo, Pham, et al., 2003), E5-VEGF/K5 could partially withstand a strong chaotropic agent (data not shown). Altogether, these results are consistent with our dimeric construct having two available E5 moieties promoting avidity when interacting with the K5-functionalized surface. Further experiments addressing the stoichiometry of the interaction occurring at the surface may be required to confirm this hypothesis.

4.9 Tethered E5-VEGF bioactivity in serum-free conditions

Cysteine-tagged K5 peptides were immobilized onto aminated glass substrates compatible with cell culture, via a LC-SPDP linker. Non-specific binding sites were blocked with bovine serum albumin (BSA). The substrates were then exposed to 20 nM of either E5-VEGF or untagged hVEGF₁₆₅, which corresponded to the plateau value for E5-VEGF surface density on glass surfaces (data not shown). We determined that 31.5 ± 16.5 and 0.13 ± 0.07 fmol/cm² were captured onto the K5-functionalized surfaces, respectively (data not shown). The results confirmed the specificity of our approach, since non-specific binding of hVEGF₁₆₅ onto K5-derivatized surfaces was negligible (0.4 % of the level of specific E5-VEGF capture), as previously observed with untagged EGF (Boucher et al., 2009; Liberelle et al., 2010).

HUVE cells were then allowed to adhere in complete medium for 4 h on pristine or functionalized glass substrates (data not shown). The adhesion levels on E5-VEGF/K5- and K5-derivatized surfaces were very much akin after 4 h, but significantly higher (241 ± 31 %) than those observed on BSA-covered surfaces. To avoid any bias due to quorum sensing effects in subsequent survival assays, cell seeding was adjusted to reach the same number of cells on all surfaces after 4 h (i.e. $4.5 \pm 0.06 \times 10^3$ cells/cm², data not shown). The cells were then incubated in serum-free medium for 48 h, prior to fixing and counting (**Figure 4-7**). The relative HUVE cell survival rate was found to be significantly higher on E5-VEGF/K5-derivatized surfaces (36.9 ± 3.1 %) than on both K5-functionalized (15.7 ± 2.7 %) and BSA-blocked (13.0 ± 6.0 %) surfaces. The data thus unambiguously demonstrated that hVEGF₁₆₅ retained its biological activity upon tethering via coiled-coil interactions. As a positive control, cells adhered on K5-functionalized glass surfaces were exposed to 1.5 nM diffusible untagged hVEGF₁₆₅, which corresponds to the plateau value

extracted from previous assays in solution (data not shown). The cell number in these wells exceeded the cell count from all other conditions (i.e. 57.8 ± 11.8 % survival).

4.10 Discussion

Interestingly, Backer et al. reported higher cell response after 96-hour incubation on single-chain hVEGF₁₂₁ (scVEGF)-tailored fibronectin than on fibronectin with diffusible scVEGF (Backer et al., 2006). Similarly, Anderson et al. demonstrated that HUVE cell response was strongly enhanced after 120-hour incubation on VEGF₁₆₅-derivatized surfaces (3.8-4.4 fmol/cm²), but still remained significantly lower than the positive control (4.4 nM soluble VEGF₁₆₅) (Anderson

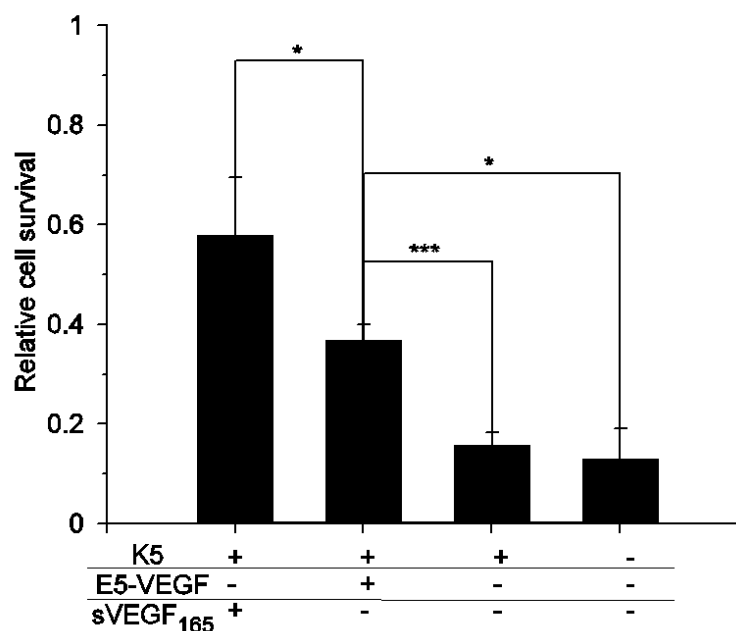


Figure 4-7 : HUVE cell survival on functionalized glass substrates, after 48 h in serum-free medium.

As positive control, the results obtained after a 48 h incubation in 1.5 nM soluble hVEGF₁₆₅ (sVEGF₁₆₅) are shown. The values are represented as the cell count after 48 h relative to the initial cell number (4500 cells/cm² for all conditions), and are given as mean value \pm standard deviation ($n \geq 3$). Statistically significant differences are indicated for $p < 0.05$ (*) and for $p < 0.0005$ (***)

et al., 2009). Our results could thus be explained by the discrepancy between immobilized (31.5 fmol) and diffusible (1.5 nM in 500 μ L, i.e. 750 fmol) hVEGF₁₆₅ in our experiment.

Of salient interest, hVEGF₁₆₅ internalization is not required for activation of KDR (Anderson, Shergill, et al., 2011), and several positive feedback loops upregulating this receptor bioavailability were described in hVEGF₁₆₅-stimulated cells (Gampel et al., 2006; Shen, B. Q. et al., 1998). With KDR being the main mediator of the mitogenic and angiogenic effects of hVEGF₁₆₅ (Ferrara et al., 2003), a sustained cellular response is expected from vascular endothelial cells exposed to this cytokine, in particular when the latter is sequestered to its support and cannot be metabolized. In that endeavor, we demonstrated in SPR-based experiments that E5-VEGF capture by K5 peptides was remarkably stable (**Figure 4-6**). The subsequent in vitro assays showed that the increase in cell survival due to 31.5 fmol of tethered E5-VEGF was about 50 % of the increase due to soluble hVEGF₁₆₅ in its most effective concentration (**Figure 4-7**). Most interestingly, 31.5 fmol of diffusible E5-VEGF – equivalent to 63 pM in 500 μ L – would induce no more than 4.8 ± 0.2 % of the maximal cell response (see **Figure 4-5** and equation (2)). Our results thus indicated that stable capture of E5-VEGF by K5 peptides on amino-coated glass increased the cytokine potency. In the present study, no morphological differences were observed between HUVE cells stimulated with tethered or diffusible hVEGF₁₆₅ (data not shown). Future work will be carried out to further demonstrate that our strategy promotes normal tissue growth over hemangioma formation and neoplasia, in particular by analyzing the cell phenotype resulting from various tethered E5-VEGF densities (Ozawa et al., 2004).

It is here noteworthy that the glass substrates were used as a model and easy-to-implement system, and shall be replaced by polymeric biomaterials for future studies. Since the coiled-coil assembly is stable in serum (Chao, H. M., Bautista, D. L., Litowski, J., Irvin, R. T., & Hodges, R. S., 1998), our strategy should enable an accurate transition from in vitro to in vivo studies. E5-VEGF-derivatized biomaterials are thus expected to exude both amplified and prolonged instructive cues, to which only the cells in their vicinity would be responsive. Our approach particularly stands out from conventional immobilization strategies, as multiple E5-tagged ligands can be concomitantly tethered, in an effort to develop multifunctional and biomimetic systems (Banfi et al., 2012; Chen, F. M., Zhang, & Wu, 2010). Moreover, K5-derivatized substrates are very stable in a wide variety of solutions (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003), and can be stored

in air for at least 4 weeks with no detectable degradation, prior to growth factor incubation (Liberelle et al., 2010).

4.11 Conclusions

We report here the design of a hVEGF₁₆₅ chimera, and its oriented immobilization on aminated and carboxylated surfaces via coiled-coil interactions. Our approach relies on a scalable and rapid protein expression and purification platform, as well as a facile chemical modification of the substrates in mild conditions that enables long-term storage. On a first layer of covalently grafted K5 peptides, E5-tagged hVEGF₁₆₅ was captured with high specificity and remarkable stability. Its subsequent bioavailability for in vitro assays was demonstrated: serum-starvation was enforced on a primary human cell line, and the immobilized construct was unambiguously shown to induce cell survival. Altogether, our results and the current knowledge in the field highlight the approach described here as a promising avenue for addressing neo- or re-vascularization in a wide range of applications.

4.12 Notes

The authors declare no competing financial interest.

4.13 Acknowledgments

This work was supported by the Canada Research Chair on Protein-Enhanced Biomaterials (G.D.C.), by the Canada Research Chair in Applied Metabolic Engineering (M.J.), by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (G.D.C., M.J.), by the MEDITIS training program (F.M.), and by the Biomedical Science and Technology Research Group (G.D.C., M.J., B.L. and F.M.).

4.14 References

Anderson, S. M., Chen, T. T., Iruela-Arispe, M. L., & Segura, T. (2009). The phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) by engineered surfaces with electrostatically or covalently immobilized VEGF. *Biomaterials*, 30(27), 4618-4628. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.030

Anderson, S. M., Shergill, B., Barry, Z. T., Manousiouthakis, E., Chen, T. T., Botvinick, E., . . . Segura, T. (2011). VEGF internalization is not required for VEGFR-2 phosphorylation in bioengineered surfaces with covalently linked VEGF. *Integrative Biology*, 3(9), 887-896. doi: 10.1039/c1ib00037c

Backer, M. V., Patel, V., Jehning, B. T., Claffey, K. P., & Backer, J. M. (2006). Surface immobilization of active vascular endothelial growth factor via a cysteine-containing tag. *Biomaterials*, 27(31), 5452-5458. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.025

Banfi, A., von Degenfeld, G., Gianni-Barrera, R., Reginato, S., Merchant, M. J., McDonald, D. M., & Blau, H. M. (2012). Therapeutic angiogenesis due to balanced single-vector delivery of VEGF and PDGF-BB. *FASEB Journal*, 26(6), 2486-2497. doi: 10.1096/fj.11-197400

Boucher, C., Liberelle, B., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2009). Epidermal growth factor tethered through coiled-coil interactions induces cell surface receptor phosphorylation. *Bioconjugate Chemistry*, 20(8), 1569-1577. doi: 10.1021/bc9001147

Boucher, C., Ruiz, J. C., Thibault, M., Buschmann, M. D., Wertheimer, M. R., Jolicoeur, M., . . . De Crescenzo, G. (2010). Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions. *Biomaterials*, 31(27), 7021-7031. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.072

Boucher, C., St-Laurent, G., Loignon, M., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2008). The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags. *Tissue Engineering. Part A*, 14(12), 2069-2077. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0037

Cass, B., Pham, P. L., Kamen, A., & Durocher, Y. (2005). Purification of recombinant proteins from mammalian cell culture using a generic double-affinity chromatography scheme. *Protein Expression and Purification*, 40(1), 77-85. doi: 10.1016/j.pep.2004.10.023

Chao, H. M., Bautista, D. L., Litowski, J., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1998). Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. *Journal of Chromatography B*, 715(1), 307-329. doi: 10.1016/S0378-4347(98)00172-8

Chen, F. M., Zhang, M., & Wu, Z. F. (2010). Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials*, 31(24), 6279-6308. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.053

Chen, Z., Popp, B. V., Bovet, C. L., & Ball, Z. T. (2011). Site-specific protein modification with a dirhodium metallopeptide catalyst. *ACS Chemical Biology*, 6(9), 920-925. doi: 10.1021/cb2001523

Chung, Y. I., Kim, S. K., Lee, Y. K., Park, S. J., Cho, K. O., Yuk, S. H., . . . Kim, Y. H. (2010). Efficient revascularization by VEGF administration via heparin-functionalized nanoparticle-fibrin complex. *Journal of Controlled Release*, 143(3), 282-289. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.01.010

Claffey, K. P., Senger, D. R., & Spiegelman, B. M. (1994). Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Acta Chemica Scandinavica*, 4896(Compendex), 1-1.

Claffey, K. P., Senger, D. R., & Spiegelman, B. M. (1995). Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1246(1), 1-9. doi: 10.1016/0167-4838(94)00144-6

De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry*, 42(6), 1754-1763. doi: 10.1021/bi0268450

De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. *Journal of Molecular Biology*, 328(5), 1173-1183. doi: 10.1016/s0022-2836(03)00360-7

Dolle, J. P., Rezvan, A., Allen, F. D., Lazarovici, P., & Lelkes, P. I. (2005). Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(3), 1220-1227. doi: 10.1124/jpet.105.093252

Durocher, Y., Perret, S., & Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Research*, 30(2), E9. doi: 10.1093/nar/30.2.e9

Edlund, U., Sauter, T., & Albertsson, A. C. (2011). Covalent VEGF protein immobilization on resorbable polymeric surfaces. *Polymers for Advanced Technologies*, 22(1), 166-171. doi: 10.1002/pat.1811

Ferrara, N., & Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews*, 18(1), 4-25. doi: 10.1210/edrv.18.1.0287

Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Natural Medicines*, 9(6), 669-676. doi: 10.1038/nm0603-669

Ferrari, E., Soloviev, M., Niranjana, D., Arsenault, J., Gu, C., Vallis, Y., . . . Davletov, B. (2012). Assembly of protein building blocks using a short synthetic peptide. *Bioconjugate Chemistry*, 23(3), 479-484. doi: 10.1021/bc2005208

Gampel, A., Moss, L., Jones, M. C., Brunton, V., Norman, J. C., & Mellor, H. (2006). VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood*, 108(8), 2624-2631. doi: 10.1182/blood-2005-12-007484

Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M. H., Keyt, B. A., Dixit, V., & Ferrara, N. (1998b). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase Akt signal transduction pathway - Requirement for Flk-1/KDR activation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30336-30343. doi: 10.1074/jbc.273.46.30336

Hodges, R. S., Mills, J., McReynolds, S., Kirwan, J. P., Tripet, B., & Osguthorpe, D. (2009). Identification of a unique "stability control region" that controls protein stability of tropomyosin: A two-stranded alpha-helical coiled-coil. *Journal of Molecular Biology*, 392(3), 747-762. doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.039

Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., & Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 267(36), 26031-26037. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1464614>

Kendall, R. L., & Thomas, K. A. (1993b). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(22), 10705-10709. doi: 10.2307/2363296

Keyt, B. A., Berleau, L. T., Nguyen, H. V., Chen, H., Heinsohn, H., Vandlen, R., & Ferrara, N. (1996). The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *Journal of Biological Chemistry*, 271(13), 7788-7795. doi: 10.1074/jbc.271.13.7788

Lauer, G., Sollberg, S., Cole, M., Krieg, T., & Eming, S. A. (2002). Generation of a novel proteolysis resistant vascular endothelial growth factor165variant by a site-directed mutation at the plasmin sensitive cleavage site. *FEBS Letters*, 531(2), 309-313. doi: 10.1016/s0014-5793(02)03545-7

Lazarous, D. F., Shou, M., Scheinowitz, M., Hodge, E., Thirumurti, V., Kitsiou, A. N., . . . Unger, E. F. (1996). Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation*, 94(5), 1074-1082. doi: 10.1161/01.cir.94.5.1074

Liberelle, B., Bartholin, L., Boucher, C., Murschel, F., Jolicœur, M., Durocher, Y., . . . De Crescenzo, G. (2010). New ELISA approach based on coiled-coil interactions. *Journal of Immunological Methods*, 362(1-2), 161-167. doi: 10.1016/j.jim.2010.09.027

Lindhorst, D., Tavassol, F., von See, C., Schumann, P., Laschke, M. W., Harder, Y., . . . Rucker, M. (2010). Effects of VEGF loading on scaffold-confined vascularization. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 95(3), 783-792. doi: 10.1002/jbm.a.32902

Litowski, J. R., & Hodges, R. S. (2001). Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils: the effect of chain length on protein folding, stability and specificity. *Journal of Peptide Research*, 58(6), 477-492. doi: 10.1034/j.1399-3011.2001.10972.x

Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, 3(11), e442. doi: 10.1371/journal.pmed.0030442

Miyagi, Y., Chiu, L. L., Cimini, M., Weisel, R. D., Radisic, M., & Li, R. K. (2011). Biodegradable collagen patch with covalently immobilized VEGF for myocardial repair. *Biomaterials*, 32(5), 1280-1290. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.007

Moss, A. J., Sharma, S., & Brindle, N. P. (2009). Rational design and protein engineering of growth factors for regenerative medicine and tissue engineering. *Biochemical Society Transactions*, 37(Pt 4), 717-721. doi: 10.1042/BST0370717

Myoken, Y., Kayada, Y., Okamoto, T., Kan, M., Sato, G. H., & Sato, J. D. (1991). Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) produced by A-431 human epidermoid carcinoma cells and identification of VEGF membrane binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(13), 5819-5823. doi: 10.1073/pnas.88.13.5819

Noel, S., Hachem, A., Merhi, Y., & De Crescenzo, G. (2015). Development of a Polyester Coating Combining Antithrombogenic and Cell Adhesive Properties: Influence of Sequence and Surface Density of Adhesion Peptides. *Biomacromolecules*, 16(6), 1682-1694. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00219

Ozawa, C. R., Banfi, A., Glazer, N. L., Thurston, G., Springer, M. L., Kraft, P. E., . . . Blau, H. M. (2004). Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 113(4), 516-527. doi: 10.1172/JCI18420

Porter, A. M., Klinge, C. M., & Gobin, A. S. (2011). Biomimetic hydrogels with VEGF induce angiogenic processes in both hUVEC and hMEC. *Biomacromolecules*, 12(1), 242-246. doi: 10.1021/bm101220b

Potgens, A. J. G., Lubsen, N. H., Vanaltena, M. C., Vermeulen, R., Bakker, A., Schoenmakers, J. G. G., . . . Dewaal, R. M. W. (1994). Covalent Dimerization of Vascular-Permeability Factor Vascular Endothelial Growth-Factor Is Essential for Its Biological-Activity - Evidence from Cys to Ser Mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 32879-32885. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7806514>

Rich, R. L., & Myszka, D. G. (2000). Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(1), 54-61. doi: 10.1016/S0958-1669(99)00054-3

Sharon, J. L., & Puleo, D. A. (2008). Immobilization of glycoproteins, such as VEGF, on biodegradable substrates. *Acta Biomaterialia*, 4(4), 1016-1023. doi: 10.1016/j.actbio.2008.02.017

Shen, B. Q., Lee, D. Y., Gerber, H. P., Keyt, B. A., Ferrara, N., & Zioncheck, T. F. (1998). Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 29979-29985. doi: 10.1074/jbc.273.45.29979

Shen, Y. H., Shoichet, M. S., & Radisic, M. (2008). Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 477-489. doi: 10.1016/j.actbio.2007.12.011

Shinkai, A., Ito, M., Anazawa, H., Yamaguchi, S., Shitara, K., & Shibuya, M. (1998). Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31283-31288. doi: 10.1074/jbc.273.47.31283

Stone, G. W., Moses, J. W., Ellis, S. G., Schofer, J., Dawkins, K. D., Morice, M., . . . Leon, M. B. (2007). Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *New England Journal of Medicine*, 356(10), 998-1008. doi: 10.1056/NEJMoa067193

Swanson, N., Hogrefe, K., Javed, Q., Malik, N., & Gershlick, A. H. (2003). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-eluting stents: in vivo effects on thrombosis, endothelialization and intimal hyperplasia. *Journal of Invasive Cardiology*, 15(12), 688-692. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14660819>

Tripet, B., Yu, L., Bautista, D. L., Wong, W. Y., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1996). Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain off the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. *Protein Engineering*, 9(11), 1029-1042. doi: 10.1093/protein/9.11.1029

Van Belle, E., Tio, F. O., Couffinhal, T., Maillard, L., Passeri, J., & Isner, J. M. (1997). Stent endothelialization: time course, impact of local catheter delivery, feasibility of recombinant protein administration, and response to cytokine expedition. *Circulation*, 95(2), 438.

Wang, Y., Fei, D., Vanderlaan, M., & Song, A. (2004). Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis*, 7(4), 335-345. doi: 10.1007/s10456-004-8272-2

Wu, X. F., Yin, Z. Z., Cao, C. P., Huang, L., Lu, X. M., Liu, J. X., & Cui, W. Z. (2004). Expression of human VEGF165 in silkworm (*Bombyx mori* L.) by using a recombinant baculovirus and its bioactivity assay. *Journal of Biotechnology*, 111(3), 253-261. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.04.016

CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : TWO COMPLEMENTARY APPROACHES FOR THE CONTROLLED RELEASE OF BIOMOLECULES IMMOBILIZED VIA COILED-COIL INTERACTIONS: PEPTIDE CORE MUTATIONS AND MULTIVALENT PRESENTATION

Ce chapitre est dédié à l'[article](#) intitulé *Two complementary approaches for the controlled release of biomolecules immobilized via coiled-coil interactions: Peptide core mutations and multivalent presentation*, qui a été publié dans le journal *Biomacromolecules* en janvier 2017 (volume 18, numéro 3, pages 965-975). Il adresse l'objectif 2 tel que défini dans le Chapitre 3.

5.1 Résumé

Les systèmes de capture par affinité qui mettent en jeu des peptides présentent des caractéristiques de flexibilité et de polyvalence intéressantes pour la décoration de biomatériaux. Par l'attachement de biomolécules étiquetées avec le peptide E sur des substrats décorés avec le peptide K, l'hétérodimère E/K présente en particulier un fort potentiel à cet effet. Nous explorons ici deux approches permettant le contrôle de la force du complexe E/K et de sa stabilité, et ainsi son potentiel pour des applications de libération contrôlée. Ces approches comprennent soit des mutations spécifiques dans le peptide K, soit la présentation multivalente du peptide E. Grâce à des tests réalisés en flux continu sur un biocapteur SPR avec des facteurs de croissance et des nanoparticules étiquetés avec le peptide E, nous avons observé que les deux approches influaient grandement sur la vitesse de libération. Ainsi, la stabilité de la capture peut être ajustée sur une très large gamme (avec des constantes de dissociation apparentes de 0,12 pM à 270 nM). Des essais supplémentaires réalisés dans des plaques multi-puits ont montré que seule la présentation multivalente affectait la libération, ce qui peut être attribué au fait que, dans cette configuration, les puits n'étaient pas soumis à un flux continu.

5.2 Header

TWO COMPLEMENTARY APPROACHES FOR THE CONTROLLED RELEASE OF BIOMOLECULES IMMOBILIZED VIA COILED-COIL INTERACTIONS: PEPTIDE CORE MUTATIONS AND MULTIVALENT PRESENTATION

Frederic Murschel[‡], Charles Fortier[‡], Mario Jolicoeur[‡], Robert S. Hodges[§], Gregory De Crescenzo^{‡,}*

5.3 Author Affiliations

[‡]Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB), Bio-P2 Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal, QC, Canada H3C 3A7.

[§]Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Colorado, School of Medicine, Anschutz Medical Campus, Aurora, CO 80045, USA

*Corresponding author. E-mail address: gregory.decrescenzo@polymtl.ca (#7428); Fax: (514) 340-2990

5.4 Abstract

We have developed a heterodimeric coiled-coil system based on two complementary peptides, namely (EVSALEK)₅ and (KVSALKE)₅, or E and K, for the attachment of E-tagged biomolecules onto K-decorated biomaterials. We here explore two approaches to control the strength and the stability of the E/K coiled-coil complex, and thus its potential for the controlled release of biomolecules. Those are Leucine-to-Alanine mutations in the K peptide (4 peptides with 0 to 3 mutations) and multivalent presentation of the E peptide (6 bio-objects from monomeric to dimeric and *n*-meric). Using E-tagged growth factors and nanoparticles as models, SPR-based assays performed under continuous flow indicated that the release rate was strongly affected by both approaches independently, and that the strength of the capture could be finely tuned over a

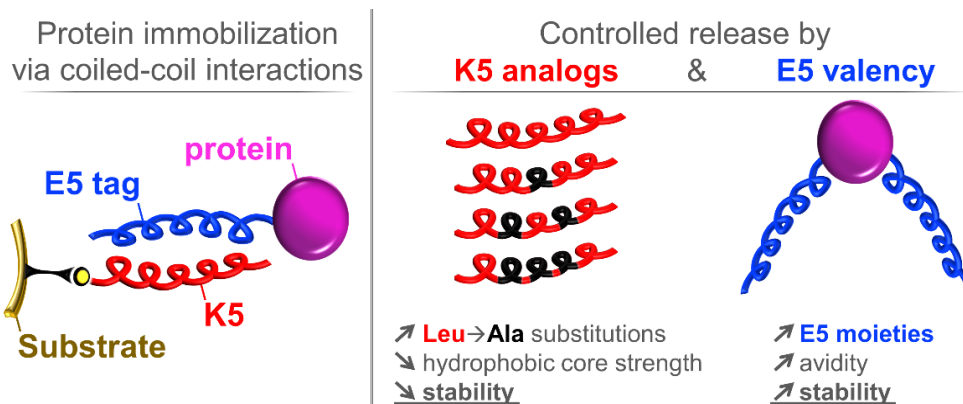


Figure 5-1 : Graphical abstract.

wide range (apparent dissociation constant from 0.12 pM to 270 nM). Further release assays carried out in well-plates showed that the multivalent presentation only had a significant influence in this setup since the wells were not rinsed under continuous flow.

5.5 Keywords

Coiled-coil, valency, mutations, growth factor, nanoparticle, surface plasmon resonance.

5.6 Introduction

The α -helical coiled-coil is a highly versatile oligomerization domain ubiquitously found in proteins. The relationship between the amino acid sequence and the resulting three-dimensional structure of the motif has been studied for over 60 years, with new insights in structure prediction constantly being provided (Parry et al., 2008). Thomas and colleagues recently positioned the α -helical coiled-coils “among the best-understood peptide/protein folds, and one of the most straightforward protein-protein interaction motifs, [making them] key targets for rational protein design and assembly” (Thomas et al., 2013). Indeed, the main folding determinants have been well characterized, the coiled-coils are relatively small in size and robust rules have been established for the rational and straightforward design of de novo homo- and heteromultimers (Hodges, 1996; Mason & Arndt, 2004; O'Shea et al., 1993; Su, Hodges, & Kay, 1994; Woolfson, 2005). Short coiled-coil peptides are generally composed of 2 to 6 repeats of a 7 amino acid sequence, denoted $(gabcdef)_n$. Positions a and d are generally occupied by nonpolar – usually aliphatic – residues that

form an interhelical hydrophobic core; positions e and g are occupied by solvent-exposed polar – usually charged – residues that participate in intra- and interhelical polar/electrostatic interactions, and the sequences feature a high helical propensity (Monera, Sereda, Zhou, Kay, & Hodges, 1995).

Presently, research in the field is heading in two main directions. First, new or improved coil peptide sequences are being designed to allow for an increasingly finer control of coiled-coil specificity and stability (Aronsson et al., 2015; De Crescenzo, Litowski, et al., 2003; Thomas et al., 2013) as well as oligomerization state (Fletcher et al., 2012; Pechar et al., 2014). For instance, Aronsson and colleagues reported a set of 4 peptides that, when mixed at equimolar concentrations, self-sorted and formed only 2 heterodimeric assemblies among the 10 possible dimers (6 heterodimers and 4 homodimers) (Aronsson et al., 2015). Second, an increasing number of bioconjugates that could advance the development of synthetic biology are being reported. Coiled-coils were indeed described as a “multipurpose building block” with enough versatility to form, for example, fibers, dendrimers, linkers between molecules or subcellular structures (Robson Marsden & Kros, 2010) and thus provide “toolkits [that can] solve problems across many different biological systems” (Fletcher et al., 2012). The proposed bioconjugate tools for biotechnological and biomedical applications include polymers conjugated with a coiled-coil-forming peptide (Gerling-Driessen et al., 2015; Jing, Rudra, Herr, & Collier, 2008; Pechar et al., 2014) combined or not with recombinant protein fusions (Fortier et al., 2013; Murschel et al., 2013; Pechar et al., 2011; Tripet et al., 1996) and nanoparticles (Assal, Mizuguchi, Mie, & Kobatake, 2015; Fortier et al., 2013) featuring the complementary coiled-coil-forming peptide.

We have previously reported a heterodimeric coiled-coil system formed by two complementary peptides from the VSAL family, (*EVSALEK*)_n and (*KVSALKE*)_n, and thoroughly characterized the influence of the number of heptad repeats (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003; Litowski & Hodges, 2001) and site-specific mutations (Litowski & Hodges, 2002) over folding, stability and specificity of the coiled-coil motif. The high affinity of the pair of 5-heptad-long peptides, denoted E5 and K5, was further exploited for the site-specific immobilization of recombinant human epidermal and vascular endothelial growth factors (EGF and VEGF₁₆₅, respectively) onto devices for tissue engineering and/or regenerative medicine (Boucher, Ruiz, et al., 2010; Murschel et al., 2013) as well as nanoparticles for gene delivery (Fortier et al., 2013) (see **Figure 5-2.A**). Interestingly, our strategy led to a highly stable surface sequestration, especially for E5-tagged VEGF when captured onto K5-decorated materials (Murschel et al., 2013).

The presentation of wild-type biomolecules *in vivo* is generally transient and sensitively tuned, in terms of presentation, concentration and dose. For instance, alternative splicing in the human VEGF-A gene leads to several variants that display different binding affinities for the extracellular matrix (ECM) (Ferrara, 2010). More precisely, the long isoforms (VEGF₁₈₉ and VEGF₂₀₆) are completely bound to heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) on the cell surface or on the ECM and remain, as such, sequestered until an appropriate signal (addition of heparin or plasmin) mediates their release. At equilibrium, about 50% of VEGF₁₆₅, the predominant isoform, is found in solution, whereas VEGF₁₂₁ does not bind HSPGs at all. This natural mechanism allows for the fine regulation of VEGF concentration and total dose, which is critical to control cell proliferation, migration and overall fate (Ozawa et al., 2004). Moreover, during tissue formation, e.g. for blood vessel growth and maturation (angiogenesis), multiple growth factors are coordinated in terms of sequence (Cao & Mooney, 2007) and relative doses (Banfi et al., 2012). For complex tissue to be grown via engineered biomaterials, it is accordingly essential that the spatiotemporal release of cytokines be controlled (Martino et al., 2015). In that endeavor, we sought to broaden the stability range of our immobilization strategy, that is, to control the release of biomolecules immobilized via coiled-coil interactions, through two complementary approaches: (i) peptide core mutations to control stability and (ii) multivalent presentation systems (see **Figure 5-2.B-C**).

(i) Our rationale led to the design of three de novo 35-residue analogues to the K5 peptide, namely K5_1, K5_2 and K5_3 peptides, featuring one, two and three Leucine-to-Alanine substitutions, respectively (**Figure 5-2.C**). The affinity and the kinetics of the interaction of the four K5 peptides with E5 were determined using a surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor.

(ii) We produced model E5-bearing nanoparticles, obtained by autoassembly of poly(ethylene imine) and carboxymethylated dextran (**Figure 5-2.B**). Further SPR-based assays with the four K peptide variants and monomeric E5-EGF, dimeric E5-VEGF, as well as the nanoparticles with varying E5 surface densities, were performed to assess how valency impacts the stability following capture. As the complexity of coil-bearing bioconjugates rises, e.g. with supramolecular materials formed by complementary peptide-polymer conjugates (Assal et al.,

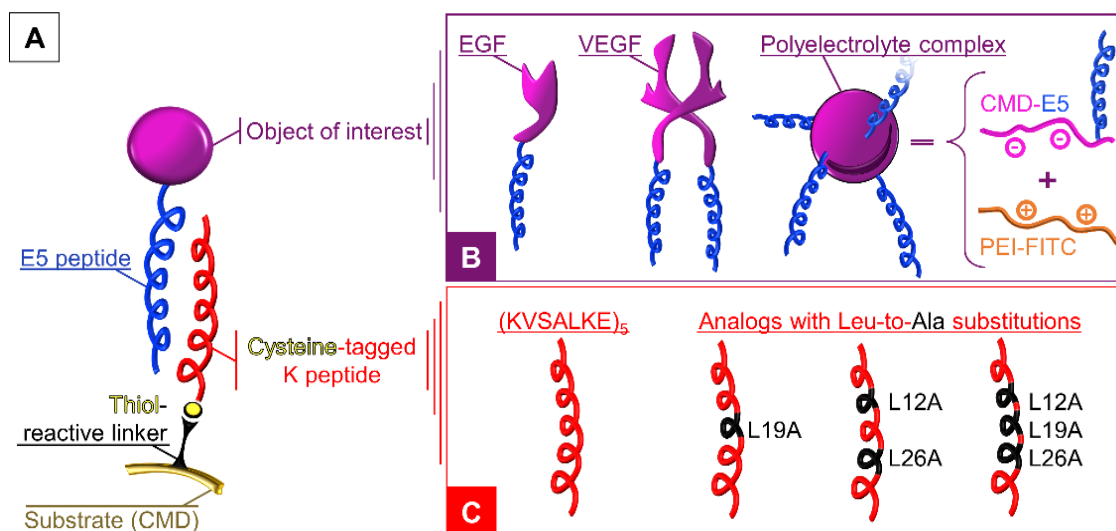


Figure 5-2 : Immobilization (A) and controlled release (B-C) strategies using coiled-coil interactions.

(A) A K peptide with an N-terminal CGG extension is grafted by thiol coupling on the substrate, carboxymethylated dextran (CMD). The E5-decorated object is then incubated on the modified substrate to allow for E/K coiled-coil formation. (B) Influence of the number of E5 moieties: monomeric epidermal growth factor (EGF, 1 tag), dimeric vascular endothelial growth factor (VEGF, 2 tags) and nanoparticles/polyelectrolyte complexes (PEC, 0-*n* tags) formed by auto-assembly of poly(ethylene imine) (PEI) and CMD-E5. (C) Influence of the sequence of the K peptide: K5 and three analogs with 1 to 3 Leucine-to-Alanine substitutions in position *d*.

2015; Jing et al., 2008), there is indeed an emerging need to understand the influence of multivalency in coiled-coil interactions (Gerling-Driessen et al., 2015).

5.7 Materials

Trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Pierce (Rockford, IL). HPLC-grade acetonitrile was obtained from Fisher Scientific (Fairlawn, NJ). Fluoroenylloxymethylcarbonyl (Fmoc) amino acids were obtained from Novabiochem (San Diego, CA). Rink Amide MBHA (methoxybenzhydrylamine) resin was obtained from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). CellBIND microplates were obtained from Corning Inc. (Corning, NY); technical grade T dextrans from

Pharmacosmos A/S (Holbaek, Denmark) and polyallylamine (PAAm) from Polysciences Inc. (Warrington, PA). CM3 and CM5 biosensor chips, PDEA linker and HBS-EP buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% v/v surfactant P20) were purchased from GE Healthcare (Baie d'Urfe, QC). Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), sodium chloride (99.99% purity), N-hydroxysuccinimide (NHS), ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), β -mercaptoethanol (99+% purity), divinyl sulfone (DVS), branched PEI 25 kDa (99+% purity), and Amicon Ultrafilters were obtained from MilliporeSigma (Oakville, ON). Commercially available untagged hVEGF165, corresponding antibodies and ELISA DuoSet kits were purchased from R&D systems (Minneapolis, MN). Milli-Q grade water (18.2 M Ω .cm) was generated with a Millipore Gradient A 10 purification system (Etobicoke, ON). All absorbance and fluorescence measurements were carried out on a Victor V Multilabel Counter from PerkinElmer Inc. (Woodbridge, ON).

5.8 Methods

5.8.1 Peptide synthesis, purification and characterization

Synthesis of the amphipathic peptides E5, K5 and analogues (**Table 5-1**) was carried out by standard solid-phase peptide synthesis methodology using fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) chemistry, rink amide 4-methylbenzhydrylamine resin and a CEM Liberty System microwave assisted synthesizer (Matthews, NC). The coupling procedure was catalyzed by hydroxybenzotriazole in dimethylformamide (DMF)/dichloromethane (DCM) (1:1 v/v) with N,N-diisopropylethylamine (DIPEA) for 10 min. The resin was then split and a portion underwent a manual addition of a C-terminal Cys-Gly-Gly extension. The N-terminal α -amino group of the peptides underwent acetylation using a 10 fold excess of acetic anhydride and DIPEA in DMF/DCM (1:1 v/v). Side-chains were eventually deprotected and the peptides were cleaved from the resin using trifluoroacetic acid (TFA)/triisopropylsilane/ethanedithiol/water (90:5:2.5:2.5 v/v) for 2 h at RT. Crude peptides were then dissolved in 50% v/v aqueous acetonitrile and lyophilized. Crude peptides were purified by reversed-phase chromatography (RP-HPLC) in 0.05% v/v TFA with a linear gradient of 2% CH₃CN per min from 0 to 11-20% (depending on the peptide) followed by a gradient of 0.1% CH₃CN per min. Separation was performed at 70°C to prevent aggregation and improve separation and peak shape, using an Agilent 1100 Series liquid chromatograph and a

semipreparative temperature-resistant Zorbax 300SB-C18 column (StableBond, 250×9.4 mm i.d., 5- μ m particle size, 300-Å pore size) from Agilent Technologies (Englewood, CO). Purified peptides were then lyophilized. The homogeneity of the purified peptides was verified by analytical RP-HPLC using a Zorbax 300SB-C18 column at 50°C (150×4.6 mm i.d., 5- μ m particle size, 300-Å pore size) from Agilent Technologies. The final products were analyzed by mass spectrometry on a VG Quattro triple quadrupole mass spectrometer from VG Biotech (Altrincham, UK) and quantified by amino acid analysis on a Beckman 6300 amino acid analyzer (San Ramon, CA).

5.8.2 Protein synthesis, purification and characterization

E5-tagged proteins – E5-EGF, E5-RFP (RFP, red fluorescence protein) and E5-VEGF – were produced in HEK293-6E cells cultured in F17 medium and purified by affinity chromatography, as previously described (Murschel et al., 2013). E5-EGF and E5-VEGF were quantified by ELISA, and their biological activities were assessed by receptor phosphorylation in A-431 and HUVEC (human umbilical vein cells) survival assays, respectively. E5-RFP was quantified by fluorescence measurements. The proteins were stored at -80°C until use.

5.8.3 Nanoparticle preparation, purification and characterization

5.8.3.1 Fluorescein-PEI (PEI-FITC)

1 mL of fluorescein isothiocyanate (FITC, 5 mg/mL in DMSO) was added drop by drop in a stirred 10-mL solution of branched poly(ethylene imine) (PEI, 25 kDa, 2 mg/mL in 10 mM NaHCO₃, pH 9.0). The conjugation was performed in the dark at room temperature, under constant stirring for 16 h. The excess unreacted FITC was removed and the buffer was exchanged with 10 mM HEPES buffer pH 7.0 by using centrifugal filter devices with a nominal molecular weight limit of 3 kDa (3 cycles with HEPES:DMSO 9:1 followed by 2 cycles with HEPES). The final product, PEI-FITC, was 0.2 μ m-filtered and stored at -20°C. Polymer quantification using the Orange II-based colorimetric method (Drogoz, David, Rochas, Domard, & Delair, 2007) and fluorescein quantification by fluorescence readings at 485/535 nm (excitation/emission) indicated a final content of 3.4 μ mol fluorescein per g of PEI.

5.8.3.2 Carboxymethylated dextrans (CMD)

20-kDa technical grade dextran was first carboxymethylated as previously described (Fortier, Louvier, Durocher, & De Crescenzo, 2015). Briefly, dextrans were dissolved in water with NaOH, and the reaction was initiated by adding a solution of monobromoacetic acid (final concentrations: 35 mg/mL dextran, 2.63 M NaOH and 0.95 M monobromoacetic acid). The reaction was carried out at room temperature under constant stirring, then quenched with HCl (final concentration: 1.95 M) after either 30 or 120 min to obtain CMD20-30 and CMD20-120, respectively. The preparations were then desalted against water five times using 3-kDa centrifugal filter devices before freeze-drying. The purified preparations were subsequently examined by ^1H NMR as 5 mg/mL solutions in D_2O . Peak integration revealed that 35% and 72% of the saccharide units of CMD20-30 and CMD20-120, respectively, bore carboxyl moieties.

5.8.3.3 Vinyl sulfone (VS) dextrans

CMD20-120 along with 70-kDa dextran (D70) were then modified with divinyl sulfone (DVS) as previously described (Noel et al., 2016). Briefly, dextrans were dissolved in water with NaOH, and the reaction was initiated by adding a solution of DVS (final concentrations: 20 mg/mL dextran, 85 mM NaOH, 0.5 M DVS). The reaction was carried out at room temperature under constant stirring, and quenched with HCl (final concentration: 120 mM) after either 2 or 3 min to obtain CMD20-120-VS and D70-VS, respectively. The preparations were then desalted against water five times using 3-kDa and 10-kDa centrifugal filter devices, respectively, before freeze-drying. ^1H NMR was performed on the purified preparations, and peak integration revealed that 11% and 80% of the saccharide units of CMD20-120-VS and D70-VS, respectively, were modified with vinyl sulfone.

5.8.3.4 Polyelectrolyte complexes (PEC)

One volume of 1.4 mg/mL CMD20-120-VS was mixed with one volume of 0.06 mg/mL PEI-FITC to obtain a final 8:1 ratio of charge carriers ($\text{COO}^-:\text{NH}_3^+$) in HBS (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4). The suspension was immediately vortexed and incubated for 15 min in the dark at room temperature. Excess CMD20-120-VS was removed through 5 cycles of 100-kDa centrifugal filters against HBS+CMD (HBS containing 1 mg/mL of CMD20-30 to prevent the dissociation of the complexes). The fluorescein content of the resulting polyelectrolyte complexes

(PEC) was then quantified by fluorescence readings to determine PEC concentrations (expressed in mg/mL of PEI).

One volume of PEC-VS (0.7 mg/mL PEI) was mixed with one volume of CGG-E5 (concentration ranging from 0 to 100 μ M) in HBS+CMD. The suspension was incubated for 48 h in the dark at room temperature, and the uncoupled VS moieties were blocked by adding β -mercaptoethanol (1 mM final). Unreacted CGG-E5 and excess β -mercaptoethanol were removed through 3 cycles of 100-kDa centrifugal filters against HBS+CMD. The resulting polyelectrolyte complexes (PEC-E5) were then stored at -80°C and quantified by fluorescence readings.

5.8.3.5 PEC characterization

The preparations of PEC with various E5 surface densities were quantified by fluorescence readings. The nanoparticles were further evaluated by dynamic light scattering for hydrodynamic diameter and zeta potential measurements on a ZetaSizer Nano ZS from Malvern Instruments (Montreal, QC), as previously described (Fortier et al., 2015).

5.8.4 SPR-based assays

Real-time kinetic studies were performed at 25°C on a Biacore T100 biosensor, using HBS-EP as running buffer. Functionalization of the surfaces was performed at 10 μ L per min, as previously described (Murschel et al., 2013). Briefly, the dextran layer of the chip (CM3 for nanoparticle injections and CM5 for all other assays) was activated with NHS/EDC (N-hydroxysuccinimide/1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodimide hydrochloride) to allow for the immobilization of a PDEA linker using amine coupling. Remaining carboxyl moieties were inactivated with 1 M ethanolamine before CGG-K peptides were injected. Remaining thiol moieties were inactivated with cysteine. Mock surfaces were prepared according to the same protocol, except that K peptide injections were replaced by cysteine injections. The proteins (E5, E5-EGF and E5-VEGF) were then injected for 120 s at $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, followed by a 480 s dissociation phase. Surface regeneration was performed by two pulses of a mixture of 6 M guanidine hydrochloride and CH_3CN at a 4:1 ratio. Sensorgrams were recorded and analyzed using the double-referencing technique on the BIAevaluation software. For the nanoparticles only, the

flow rate was set at 50 μL per min and data are shown after the subtraction of the signal corresponding to control particles (no E5).

5.8.5 Protein capture and release assessed by ELISA

5.8.5.1 K peptide-modified surfaces

The preparation of low-fouling 96-well plates decorated with K peptides was performed as previously described (Noel et al., 2016). Briefly, polyallylamine (PAAm) was grafted to CellBIND® 96-well microplates by NHS/EDC carbodiimide chemistry in 100 mM MES buffer at pH 4.7, then vinyl sulfone-modified 70-kDa dextran (see preparation) was allowed to react with the primary amino groups in borate 50 mM, pH 10. The four CGG-K peptide analogues were incubated next at a concentration of 0.5 and 5 μM (for E5-VEGF and E5-RFP, respectively) on the VS-dextran-modified surfaces in PBS supplemented with 50 μM Tris(2-2 carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP). Control surfaces were prepared by reacting the vinyl sulfone (VS) moieties with β -mercaptoethanol before K peptide incubation. The remaining VS groups were eventually blocked with 100 μM β -mercaptoethanol in PBS.

5.8.5.2 E5-VEGF capture and release

E5-VEGF capture by K peptide-derivatized surfaces was performed as previously described, at concentrations ranging from 50 pM to 50 nM after an over-night blocking step with 10% v/v Fetal Bovine Serum (FBS) (Noel et al., 2016). A direct ELISA using anti-VEGF₁₆₅ antibodies was performed to assess the amount of immobilized protein and the results are presented in arbitrary units, as previously reported (Murschel, Zaimi, Noel, Jolicoeur, & De Crescenzo, 2015). To follow E5-VEGF release from the different surfaces over time, the protein concentrations were adjusted to reach the same ELISA signal over all surfaces at $t = 0$ h: 62 ± 3 a. u. were obtained by incubating 50 pM, 50 pM, 200 pM and 3000 pM over K5, K5_1, K5_2 and K5_3, respectively. After an initial washing step, the surfaces were incubated in PBS for up to 7 days, with a daily change of buffer. Samples were regularly tested by direct ELISA to evaluate the level of protein remaining on the surface.

5.8.5.3 E5-RFP capture and release

E5-Red Fluorescent Protein (E5-RFP) capture by K peptide-derivatized surfaces was performed at an excess concentration of 5 μM protein for 1 h. After rinsing, the wells were filled with PBS for up to 8 days, with a daily change of buffer. The amount of immobilized protein over time was assessed by taking fluorescence pictures at 584/607 nm (excitation/emission) at the bottom of the wells using an AX10 Imager from Carl Zeiss Microscopy (Peabody, MA). Fluorescence of a control solution of E5-RFP was also measured at each time point to assess protein denaturation over time. The raw pictures were taken each day under the same excitation conditions and all adjusted to obtain the same contrast and luminosity. The pictures were then processed using the ImageJ open source software (<https://imagej.net>), and their mean intensity was measured (Tool Analyze/Measure). The intensity levels were then corrected (i) by subtracting the blank (intensity measured in a well with no E5-RFP) and (ii) by normalizing to the fluorescence level of the control solution. The final data are presented relative to the signal obtained at $t = 0$.

5.9 Results and discussion

5.9.1 Rationale for peptide design

A strategy that our team (Boucher, Ruiz, et al., 2010; Fortier et al., 2013; Noel et al., 2016) and other researchers (Assal et al., 2015; Gerling-Driessen et al., 2015; Pechar et al., 2014) have adopted for the surface modification of biomaterials entails the use of coiled-coils: first, the substrate is modified with one coil peptide (in our case, K5 is covalently grafted); then, a bioconjugate bearing the second peptide is incubated for capture (in our case, an E5-tagged biomolecule) (see **Figure 5-2.A**). The E5/K5 coiled-coil interaction proved to be very strong, with a free energy of unfolding between 10.5 and 11.9 kcal.mol^{-1} , as determined by SPR-based biosensor (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003) and guanidine hydrochloride denaturation assays (Litowski & Hodges, 2001), respectively. The potential benefits of increasing the release rate of tethered biomolecules, see facilitating their internalization by cells, has motivated our search for coiled-coil derivatives with lower stability. It is worth noting here that the production of bioactive E5-tagged biomolecules including growth factors (Boucher, Ruiz, et al., 2010; Murschel et al., 2013) is time-consuming and costly. This contrasts with the chemical synthesis or the bacterial production and

the straightforward handling of peptides (Riahi, Cappadocia, Henry, Omichinski, & De Crescenzo, 2016). The focus was to develop a set of K5 peptide analogues that would bind to E5-bearing objects with different stability. Two main avenues may be followed in that endeavor. On one hand, decreasing the number of heptad repeats is a conspicuous manner to diminish the affinity of the K peptide for its partner (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003; Thomas et al., 2013). Complex interactions may however arise when using two peptides with mismatching lengths, and overhanging ends may bring about unspecific interactions, for instance with the substrate (Aronsson et al., 2015; Murschel et al., 2015). On the other hand, specific residue substitutions, which effects on coiled-coil formation and stability are well-documented (Litowski & Hodges, 2002; Tripet et al., 2000), can be implemented to avoid such drawbacks. The interface between the α helices comprises the residues at positions *a*, *d*, *e*, and *g*. Since the charged residues at positions *e* and *g* control the heterodimeric nature of the interaction, the hydrophobic core was targeted for destabilization. More specifically, we concentrated on the hydrophobic core of the three central heptads, on account of the “end-fraying” of both terminal heptads and their potential lower contribution to coiled-coil stability (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003). To get moderate-to-severe destabilization in a set of K5 analogues, *a*-positioned Valine-to-Alanine and *d*-positioned Leucine-to-Alanine substitutions are a prime choice: Alanine indeed features the lowest hydrophobicity among canonical aliphatic amino acids (Eisenberg & McLachlan, 1986). Using systematic substitutions in a 5-heptad long model peptide, we observed that both approaches led to a very similar decrease in stability (2.05 and 1.9 kcal.mol⁻¹ per residue, respectively) (Tripet et al., 2000). Statistically, Alanine has however a much greater occurrence in a *d* position relative to an *a* position in native coiled-coils (Tripet et al., 2000), which led us to elect three analogues with one, two and three Leucine-to-Alanine (L/A) substitutions in *d* position: L19A, L12A/L26A and L12A/L19A/L26A, henceforth designated K5_1, K5_2 and K5_3, respectively. Peptide sequences and physical parameters are displayed in **Table 5-1**.

5.9.2 Rationale for coiled-coil characterization

Coiled-coil interactions are often studied using isothermal titration calorimetry, guanidine denaturation assays and size-exclusion chromatography or circular dichroism (CD) spectroscopy. These techniques enable the acquisition of thermodynamic information (Pechar et al., 2014), see kinetic data when spectroscopy is coupled to a stopped-flow instrument,³⁶ but require high quantities of peptides and are performed in solution. We however sought to determine, in an environment that mimics the surface of a coiled-coil-decorated material, both the kinetic and thermodynamic constants of the interactions between the E5-bearing objects and the four K peptides. A surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor was thus preferred to the above-mentioned techniques. More precisely, in accordance with our biomolecule immobilization strategy (**Figure 5-2.A**), K peptides with an N-terminal Cys-Gly-Gly extension were covalently immobilized on a Biacore T100 biosensor chip using PDEA, a thiol-reactive linking agent. Their partners displaying the E5 peptide were then injected over the different K coil surfaces at various concentrations. To allow for an accurate comparison, the four K peptides were immobilized at similar densities, which was dictated by K5_3. Indeed, 600 resonance units (RUs) of the latter were required to record sensorgrams with an acceptable signal-to-noise ratio while working with low

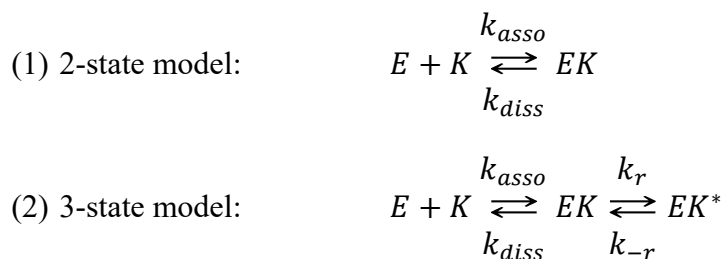
Table 5-1 : Peptide sequences, nomenclature and physical parameters.

sequence (<i>gabcdef</i>) ^a	name	MW ^b	theoretical pI ^c	aliphatic index ^d	%CH ₃ CN at elution ^e
Ac-E <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> K-NH ₂	E5	3 843	4.47	111.43	38.0
Ac-K <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE-NH ₂	K5	3 839		111.43	35.7
Ac-K <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE <u>V</u> S <u>A</u> A KE <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE-NH ₂	K5_1	3 797	9.82	103.14	32.7
Ac-K <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE <u>V</u> S <u>A</u> A KE <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE <u>V</u> S <u>A</u> A KE <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE-NH ₂	K5_2	3 755		94.86	30.0
Ac-K <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE <u>V</u> S <u>A</u> A KE <u>V</u> S <u>A</u> A KE <u>V</u> S <u>A</u> A KE <u>V</u> S <u>A</u> L <u>E</u> KE-NH ₂	K5_3	3 712		86.57	27.9

^aThe sequences are written in the one letter amino acid code, Ac represents a N^α-acetyl group and NH₂ represents a C^α-amide group. Positions *a* and *d* of the heptad repeat are underlined and form the hydrophobic core of the coiled-coil. Leucine-to-Alanine substitutions at position *d* are indicated in bold. ^bMolecular Weight in Daltons. ^cTheoretical isoelectric point (pI) and ^daliphatic index (relative volume occupied by aliphatic side chains), calculated with the ExPASy ProtParam tool. ^eAcetonitrile content at elution (% v/v) for the peptide tagged with a N-terminal CGG extension, determined from an analytical RP-HPLC run performed at 50°C.

concentrations of E5-tagged proteins, i.e., concentrations under 50 nM that are compatible with an economically viable process for the generation of protein-decorated scaffolds (see **Figure 5-3.A**). To limit possible artifacts that such high ligand densities may induce, including mass transport limitation and rebinding phenomena (Schuck & Zhao, 2010), the flow rate was fixed at the maximum setting: 100 μL per min. Furthermore, nonspecific interactions between the injected species and the sensor chip were evaluated by using a mock surface (no K peptides), and the interaction sensorgrams were also corrected by implementing the double referencing procedure (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003).

The formation of a coiled-coil complex requires the folding of the monomers into α -helices as well as the establishment of intermolecular interactions, or dimerization (Mason & Arndt, 2004). Given the high diversity of existing coiled-coil sequences and chain topologies, no paramount rule can be formulated regarding the relative kinetics, order and prevalence of both processes or regarding the occurrence of transition states (Moran, Schneider, Kentsis, Reddy, & Sosnick, 1999). Consequently, although the 2-state model of coiled-coil folding remains widely accepted as thermodynamically accurate (Aronsson et al., 2015; Mason & Arndt, 2004; Pechar et al., 2014; Thomas et al., 2013), a three (or even more)-state model of interaction cannot be discarded when studying coiled-coil interactions. Using the BIAevaluation software, the data we recorded in our various SPR-based assays were thus numerically integrated with a 1:1 Langmuirian model of interaction (two states, Mechanism 1) and, when necessary, with a second model involving a transition state. Given that SPR-based biosensors only detect surface-bound species, a model of dimerization followed by a rearrangement of the dimer was chosen (three states, Mechanism 2):



where k_{asso} ($\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$), k_{disso} (s^{-1}), k_r (s^{-1}) and k_{-r} (s^{-1}) are the kinetic constants of association, dissociation, forward rearrangement and backward rearrangement, respectively. From these values we calculated the thermodynamic dissociation constant, $K_d = k_{disso}/k_{asso}$ (M), the thermodynamic constant for the rearrangement step, $K_r = k_{-r}/k_r$ (no unit), the apparent

thermodynamic dissociation constant, $K_{d,app} = K_d / (1 + 1/K_r)$ (M), and the free energy of association, $\Delta G = R \cdot T \cdot \ln(K_{d,app})$ (expressed in kcal.mol⁻¹).

5.9.3 L/A substitutions uncover a complex mode of interaction

Concentrations of E5 ranging from 0.5 to 50 nM were injected over ca. 600 RUs of each K analogue, and four sets (i.e., corresponding to the 4 K peptides) of double-referenced sensorgrams (in triplicates) were analyzed. The data analysis of the SPR-based assays with both the 3-state and 2-state models are shown in **Figure 5-3** and in the Supporting Information-Annexe A, **Figure annexe -1**, respectively. To compensate for variations in the recruited peptide densities and to ease comparison between sets, we chose to represent the data relative to the global maximal response (R_{max}).

For the three K peptides with L/A substitutions interacting with E5, strong deviations were observed between the simple binding model and the experimental data, especially during the dissociation phase (Supporting Information-Annexe A, **Figure annexe -1.A-C**), whereas the 3-state model depicted more closely the kinetics of complex formation and dissociation (**Figure 5-3.A-C**). The relative goodness of the fits was evaluated by comparing the χ^2 values provided by the BIAevaluation software: in all cases, the χ^2 values increased by a minimum of 21% when using the simple binding model (data not shown). In contrast, the E5/K5 interactions were well described by the simple binding model (Supporting Information-Annexe A, **Figure annexe -1.D**), with no detectable improvement upon using the 3-state model (**Figure 5-3.D**). The relative difference between the χ^2 values from the two models was lower than 6% (data not shown).

Altogether, our data indicated a 3-state model of interaction described the data adequately for all coiled-coil pairs but E5/K5. For the latter, a simple 1:1 Langmuirian model of binding was sufficient to describe the SPR data. The results are thus in excellent agreement with other kinetic studies (Donten et al., 2015; Hamed & Keten, 2014; Wang, T., Lau, DeGrado, & Gai, 2005), including our previous work on E and K peptides of varying lengths (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003). The good fits obtained with the 3-state interaction model (Mechanism 2) might let us suppose that the E/K pairs first dimerize then fold into α -helices. Importantly though, one may not conclude about the existence of such molecular mechanism without any orthogonal experimental confirmations as a number of artifacts could have also participated in the emergence of a transition

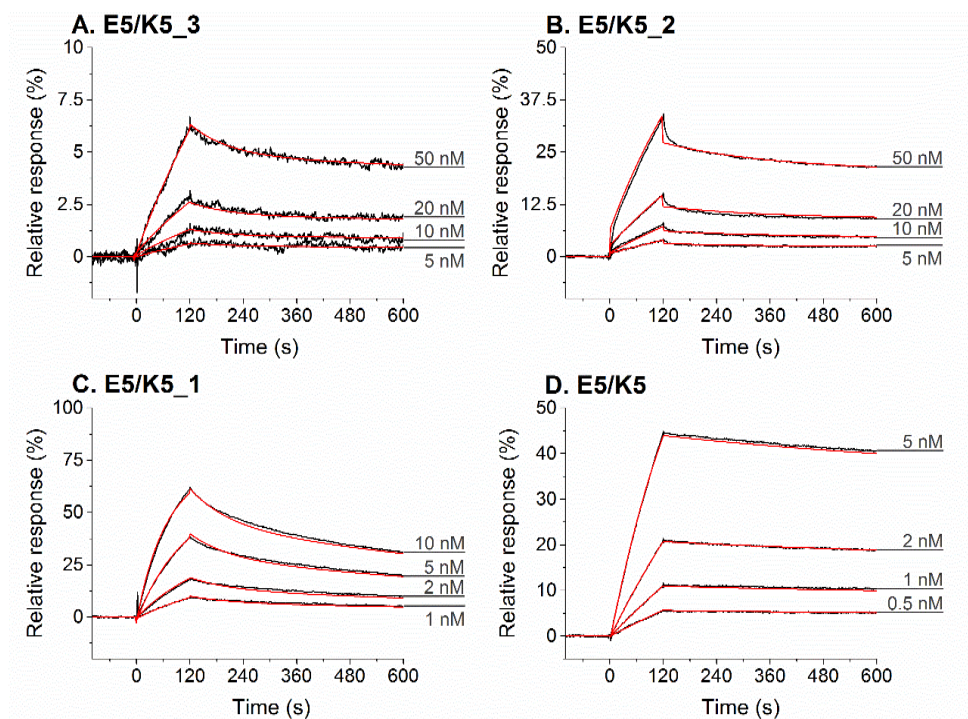


Figure 5-3 : Global analysis of the interaction of E5 with the K peptides.

Different concentrations of E5 were injected over ca. 600 RUs of (A) K5_3, (B) K5_2, (C) K5_1 and (D) K5. Black: double-referenced experimental data. Red: global fits related to the conformational change model. The data are shown relative to the global maximal response (R/R_{\max}).

state. Firstly, a folded coiled-coil assembly can undergo dynamic changes, notably helix sliding, that would be facilitated by a decrease in the strength of interhelical hydrophobic interactions (Xi, Gao, Sirinakis, Guo, & Zhang, 2012). Consequently, transition states with imperfectly paired, misfolded or staggered α -helices are all the more likely to occur as the number of L/A substitutions increases. Secondly, high surface densities of K peptides were grafted on the biosensor, that is, the peptides were in very close proximity (distance estimated at 0.33 nm, assuming a two-dimensional substrate and homogeneous distribution). Such a high local concentration could have induced the formation of K/K homodimer assemblies, despite electrostatic repulsion. This was previously observed when the K peptides were intramolecularly linked, either via a disulfide bond (Litowski & Hodges, 2001) or a polymer backbone (Gerling-Driessen et al., 2015). The high K peptide

density could have also facilitated a higher order organization (e.g. heterotetramers similar to those observed with the E4/K4 pair) (Litowski & Hodges, 2002; Pechar et al., 2014), which would also explain the deviation from the simple 1:1 model.

All things considered, the 3-state interaction model was further used to examine the differences between the K peptides, but the data, in particular the kinetic constants (k_{asso} , k_{disso} , k_r and k_{-r}), were treated with caution.

5.9.4 L/A substitutions hinder the stability of the coiled-coil complex in a position-dependent manner

The 3-state model of interaction was used to fit the data corresponding to the injections of E5 on the four K peptides (**Table 5-2**). It is here noteworthy that no obvious connections between the number of L/A substitutions and most of the kinetic parameters (k_{disso} , k_r and k_{-r}) could be inferred from the results. More, the injections of E5 on K5_2 revealed a highly peculiar dissociation phase when compared to the other peptides (**Figure 5-3.B**). These observations further suggest that the 3-state interaction model we selected may in fact describe distinct molecular mechanisms of binding (and thus distinct limiting kinetic steps) for each K coil mutant. A clear trend was observed for the thermodynamic constants: the more substitutions, the higher the K_d and the lower the K_r (see **Table 5-2**), i.e. the wider the divergence from the simple binding model.

The relative response obtained for 5 nM E5 injected over K5, K5_1, K5_2 and K5_3 decreased with the number of substitutions, reaching 44.9, 38.7, 4.2 and 0.9% of R_{max} , respectively, at the end of the injection phase (120 s, **Figure 5-3**). Accordingly, the apparent dissociation constant (global thermodynamic constant, $K_{d,\text{app}}$) steadily increased (see **Table 5-2**). When compared to the E5/K5 interaction, the free energy of association, ΔG , increased by 1.26, 1.65 and 2.98 kcal.mol⁻¹ when 1, 2 and 3 substitutions were introduced in the K peptide, respectively. Interestingly, the free energy contributions of the substitutions in the second, third and fourth heptads were apparently additive within an error of 2% (1.26 + 1.65 vs. 2.98) and with a mean increase per substitution, $\Delta\Delta G_{\text{L/A}}$, of 1.0 ± 0.2 kcal.mol⁻¹. Performing denaturation studies monitored by circular dichroism (CD) spectroscopy, Tripet and colleagues studied a L/A substitution at position d in the central heptad of a homodimeric coiled-coil, and calculated a contribution of 1.9 kcal.mol⁻¹ per residue (Tripet et al., 2000). Our results are thus in fair agreement

Table 5-2 : Kinetic and thermodynamic constants related to the global fit of the interactions of the different E5/K coiled-coil pairs when using a conformational change model.

parameter (unit)	E5/K5	E5/K5_1	E5/K5_2	E5/K5_3
k_{asso} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	$(1.00 \pm 0.01) \times 10^6$	$(1.15 \pm 0.01) \times 10^6$	$(5.75 \pm 0.03) \times 10^4$	$(1.27 \pm 0.01) \times 10^4$
k_{diss} (s^{-1})	$(2.7 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	$(5.42 \pm 0.06) \times 10^{-3}$	$(1.23 \pm 0.05) \times 10^{-3}$	$(4.2 \pm 0.2) \times 10^{-3}$
k_r (s^{-1})	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(5.12 \pm 0.06) \times 10^{-3}$	$(3.2 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	$(6.4 \pm 0.2) \times 10^{-3}$
k_{-r} (s^{-1})	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(1.62 \pm 0.01) \times 10^{-3}$	$(3.65 \pm 0.04) \times 10^{-4}$	$(4.3 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
K_d (M)	$(2.7 \pm 0.1) \times 10^{-10}$	$(4.71 \pm 0.07) \times 10^{-9}$	$(2.1 \pm 0.1) \times 10^{-8}$	$(3.3 \pm 0.2) \times 10^{-7}$
K_r (-)	$(1.01 \pm 0.4) \times 10^0$	$(3.16 \pm 0.05) \times 10^{-1}$	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-1}$	$(6.6 \pm 0.4) \times 10^{-2}$
$K_{d,\text{app}}$ (M)	$(1.35 \pm 0.06) \times 10^{-10}$	$(1.13 \pm 0.04) \times 10^{-9}$	$(2.2 \pm 0.4) \times 10^{-9}$	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^{-8}$
$^a\Delta G$ (kcal.mol $^{-1}$)	-13.47	-12.21	-11.82	-10.49
$^b\Delta\Delta G$ (kcal.mol $^{-1}$)	-	1.26	1.65	2.98
$^c\Delta\Delta G_{L/A}$ (kcal.mol $^{-1}$)	-	1.26	0.83	0.99

$^a\Delta G$: free energy of association: $\Delta G(\text{E5/K5}_n) = RT \ln K_{d,\text{app}}(\text{E5/K5}_n)$. $^b\Delta\Delta G$: free energy difference: $\Delta\Delta G(\text{E5/K5}_n) = [\Delta G(\text{E5/K5}_n) - \Delta G(\text{E5/K5})]$. $^c\Delta\Delta G_{L/A}$: free energy difference for a Leucine-to-Alanine substitution: $\Delta\Delta G_{L/A}(\text{E5/K5}_n) = \Delta\Delta G(\text{E5/K5}_n) \div n$.

with their report, given that the difference can be easily attributed to the high dissimilarity between the two techniques. Indeed, while we obtained a free energy of association of -13.47 kcal.mol $^{-1}$ for the E5/K5 interaction, Litowski et al. reported -11.9 kcal.mol $^{-1}$ by CD (Litowski & Hodges, 2001).

More specifically, the sum of the L/A substitutions in the second and fourth heptads was between 1.65 kcal.mol $^{-1}$ (when comparing E5/K5_2 with E5/K5) and 1.72 kcal.mol $^{-1}$ (when comparing E5/K5_3 with E5/K5_1). Assuming that both the second and fourth heptads equally participate in the interaction, as could be inferred from the symmetry of the peptide, each L/A substitution caused an increase in free energy between 0.83 and 0.86 kcal.mol $^{-1}$, respectively. Conversely, the contribution of the L/A substitution in the central heptad was between 1.26 kcal.mol $^{-1}$ (when comparing E5/K5_1 with E5/K5) and 1.33 kcal.mol $^{-1}$ (when comparing E5/K5_3 with E5/K5_2). It may therefore be deduced that the free energy contribution of each heptad gradually increases from the termini toward the center of the peptide, which would be a refinement of the aforementioned “end-fraying” phenomenon. The latter indeed reckons that all heptads provide an equal contribution to the coiled-coil, except for both termini that suffer from a partial unfolding (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003). Importantly, the experimental setup did not allow for complete peptide symmetry, given that the K peptides were covalently attached to the biosensor

surface at their N-terminus. Further assays, either in solution by CD spectroscopy or with a larger set of K analogues, would be required to substantiate the present conclusions.

Altogether, the biosensor experiments with E5 indicated that each Leucine-to-Alanine substitution in position d of the (KVSALKE)₅ increased the deviation from a simple Langmuirian model and decreased the strength of the interaction, in a predictable and additive fashion. Interestingly, the introduction of three L/A substitutions in the K5 peptide ($K_{d,app}$ of 21 nM for the E5/K5_3 interaction, **Table 5-2**) destabilized the interaction more than the removal of an entire heptad ($K_{d,app}$ of 5.4 nM for the E5/K4 interaction) (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003).

5.9.5 The presentation of E5 impacts the sensitivity to L/A substitutions

Concentrations of monomeric E5-tagged Epidermal Growth Factor (EGF) from 2 to 200 nM were injected over the same Kcoil-derivatized surfaces in SPR-based assays. The corrected data were also well-depicted by a conformational change model (**Table 5-3** and Supporting Information-Annexe A, **Figure annexe -2**).

The analysis of the $K_{d,app}$ and $\Delta\Delta G$ values for the interaction of E5-EGF with the K peptides revealed a pattern similar to the E5/K interactions, including the approximate additivity of the contributions ($1.76 + 2.75$ vs 4.20) and the central heptad having a higher contribution than the mean contribution of one L/A substitution in the second or forth heptad (1.45 - 1.76 kcal.mol⁻¹ and 1.22 - 1.38 kcal.mol⁻¹, respectively). Nonetheless, the mean increase in free energy per substitution, 1.5 ± 0.2 kcal.mol⁻¹, was 50% larger than the one obtained for E5. When compared to the E5 peptide, the E5 moiety of E5-EGF therefore demonstrated a greater susceptibility to hydrophobic core destabilization. Accordingly, our strategy for the controlled stability of EGF via K peptide core mutations enabled a large range of $K_{d,app}$ values covering 3 orders of magnitude, from 0.2 to 270 nM. The difference between E5 and E5-EGF could be explained by a shorter E/K coiled-coil assembly, with one or more residues at the C-terminus of the E5 moiety being either sterically hindered by EGF or involved in intramolecular interactions.

Table 5-3 : Thermodynamic constants related to the global fit of interactions of E5-tagged EGF and VEGF with the different K peptides when using a conformational change model.

E5-EGF					E5-VEGF			
parameter (unit)	K5	K5_1	K5_2	K5_3	K5	K5_1	K5_2	K5_3
$K_{d,app}$ (nM)	0.2 ± 0.1	4.5 ± 0.2	24 ± 2	270 ± 60	$(1.2 \pm 0.9) \times 10^{-4}$	$(9 \pm 1) \times 10^{-3}$	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.02
$^a\Delta G$ (kcal.mol ⁻¹)	-13.16	-11.40	-10.41	-8.96	-17.65	-15.05	-13.13	-13.13
$^b\Delta\Delta G$ (kcal.mol ⁻¹)	-	1.76	2.75	4.20	-	2.60	4.52	4.52
$^c\Delta\Delta G_{L/A}$ (kcal.mol ⁻¹)	-	1.76	1.37	1.40	-	2.60	2.26	1.51

^a ΔG : free energy of association: $\Delta G(E5-EGF/K5_n) = RT \ln K_{d,app}(E5-EGF/K5_n)$. ^b $\Delta\Delta G$: free energy difference $\Delta\Delta G(E5-EGF/K5_n) = [\Delta G(E5-EGF/K5_n) - \Delta G(E5-EGF/K5)]$. ^c $\Delta\Delta G_{L/A}$: free energy difference for a Leucine-Alanine substitution: $\Delta\Delta G_{L/A}(E5-EGF/K5_n) = \Delta\Delta G(E5-EGF/K5_n) \div n$.

5.9.6 The number of E5 moieties impacts the stability of the coiled-coil complex

Concentrations of dimeric E5-tagged Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ranging from 0.5 to 50 nM were injected over the same K-derivatized surfaces in SPR-based assays. The controlled-corrected data were also well-depicted with a 3-state reaction model than with a simple model (**Figure 5-4** and **Table 5-3**).

In the case of double-tagged VEGF, the $K_{d,app}$ values were much smaller (0.12 to 240 pM) than those corresponding to either E5 or E5-EGF (140 to 270 000 pM). As for the $\Delta\Delta G$ values, the trends observed with E5 and E5-EGF were not observed with E5-VEGF: there was no apparent additivity of the contributions and there were high variations in the mean contribution per substitution (2.1 ± 0.6 kcal.mol⁻¹). Both the (i) $K_{d,app}$ and (ii) $\Delta\Delta G$ results could be explained by a bivalent interaction due to E5-VEGF bearing two E5 moieties. (i) The overall affinity of the complex would be dramatically enhanced by an avidity phenomenon. Accordingly, the interaction with K5 was highly stable: almost no dissociation was observed during buffer injection and complete regeneration of the surface was unattainable, as previously reported (Murschel et al., 2013) (see **Figure 5-4.D** and Supporting Information-Annexe A, **Figure annexe -3**). Thus, for this peculiar interaction, only one set of sensorgrams (instead of triplicates) corresponding to the injections of increasing concentrations of E5-VEGF was globally fit to limit the bias of imperfect regeneration. Similarly, the interaction with K5_1 showed almost no dissociation, although we

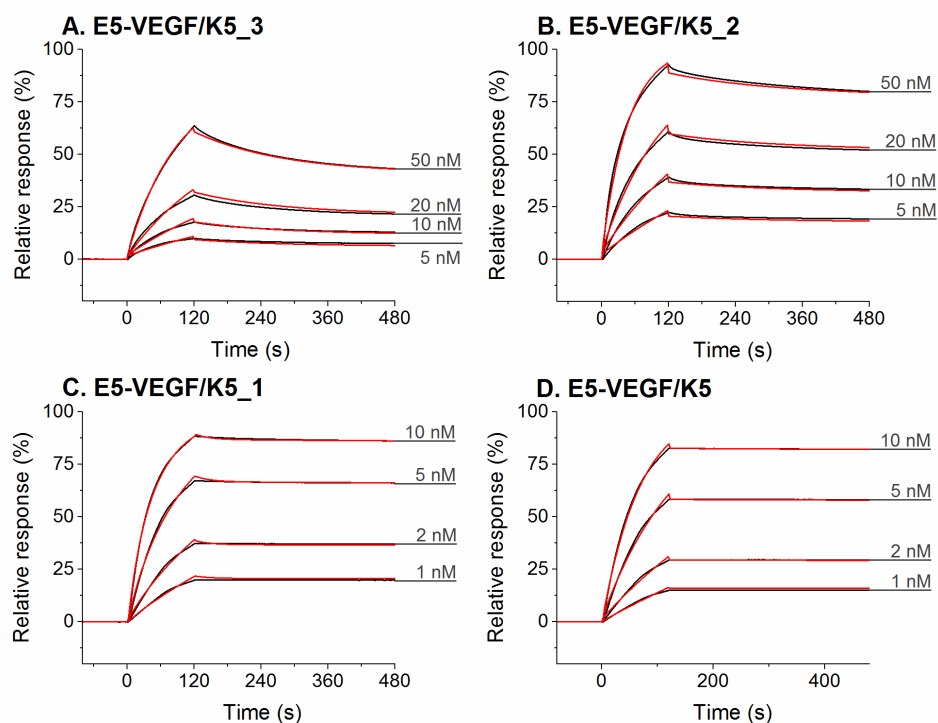


Figure 5-4 : Global analysis of E5-tagged VEGF interaction with the K peptides.

Different concentrations of E5-VEGF were injected over ca. 600 RUs of (A) K5_3, (B) K5_2, (C) K5_1 and (D) K5. Black: double-referenced experimental data. Red: global fits related to the conformational change model. The data are shown relative to the global maximal response (R/R_{\max}).

managed to regenerate the surface with a strong chaotropic agent (data not shown). (ii) With a bivalent interaction, the interaction would be possibly more complex in essence than the model that was used. Surprisingly, the 3-state change model seemed to fit the data properly (**Figure 5-4**), whereas model depicting a bivalent analyte (see Supporting Information-Annexe A, **Figure annexe -4**) or a combination of both did not (data not shown).

Altogether, the bivalent presentation of E5 significantly enhanced the stability of the coiled-coil complex, regardless of which K peptide was on the surface. By combining the two approaches for controlled stability, i.e. peptide core mutations and mono/bivalent presentation, we were thus able to cover an extremely large range of $K_{d,app}$ values for our model growth factors (more than 6 orders of magnitude, from 0.12 pM to 270 nM, **Table 5-3**). Coiled-coil interactions thus hold

promise for the design of smart biomaterials that allow for a finely controlled release of biomolecules. Such control is indeed critical in order to mimic natural biological processes, for instance physiological-like angiogenesis that requires the fast release of VEGF followed by a steady delivery of Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-BB (Briquez, Clegg, Martino, Mac Gabhann, & Hubbell, 2016). Conversely, some applications require a highly stable capture of the biomolecule on the biomaterial, e.g. the immobilization of a cell-targeting ligand on a drug delivery system (Assal et al., 2015).

Importantly here, caution is warranted in the interpretation of the numerical data obtained for E5-VEGF, in this case not only for the kinetic constants but for the global thermodynamic constants as well. Indeed, while we observed beyond question differences between the sensorgrams with K5_2 and K5_3 (**Figure 5-4.A-B**), the $K_{d,app}$ values were equal as differences in K_d values (2.4 and 14 nM, respectively) and K_r values (0.108 and 0.017, respectively) compensated each other. Further assays with nanoparticles were thus performed to evaluate if one can take advantage of this multivalency effect to control coil-decorated nanoparticle delivery.

Poly(ethylene imine) (PEI) and carboxymethylated dextran (CMD) were used to prepare model nanoparticles in the form of polyelectrolyte complexes (PECs) by electrostatic autoassembly. Prior modification of the CMD with vinyl sulfone enabled the covalent grafting via thiol coupling of E5 peptides on the PECs postcomplexation. Four PEC preparations were obtained using different E5 concentrations in order to vary E5 surface densities: control, low, medium and high (0, 0.5, 2 and 10 μM of E5 used for decoration, respectively). Dynamic light scattering measurements were carried out to assess size distribution as well as surface charge. The data presented in the Supporting Information-Annexe A, **Figure annexe -5**, indicated that the four preparations comprised one well-defined population of particles with similar hydrodynamic radius (10.1 ± 0.9 nm) and zeta potential (14.5 ± 1.2 mV). Prior modification of the PEI with fluorescein enabled the relative quantification of nanoparticles in the four preparations (expressed in $\mu\text{g/mL}$ of PEI).

The four preparations were then injected over a K5-derivatized surface in SPR-based assays at a concentration of 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of PEI. The sensorgrams once double referenced featured non-negligible interactions of the control particles with the surfaces, as well as an unusual increase in response during the dissociation phase (see Supporting Information-Annexe A, **Figure annexe -**

6). Given the elastic mechanical properties of the PECs, the increase in surface-bound material detected by the instrument could be explained by the particles rearranging or flattening. We thus chose to represent the data after a third referencing, i.e., with the response from control PECs subtracted (**Figure 5-5.A**), and observed that the higher the E5 used for the PEC decoration, the higher the response during the injection. Considering that the preparations were at a fixed PEI concentration, thus at a fixed concentration of particles, it could be argued that the boosted signals were caused by an increased fraction of PECs bearing one E5 moiety. After normalizing the data to the local maximal response, it can however be seen during the dissociation phases ($t > 120$ s) that the High-PECs interacted in a more stable manner with K5 than the two other preparations did (**Figure 5-5.B**). Similar to the avidity phenomenon observed with E5-VEGF when compared to E5-EGF (see **Table 5-3** and discussion thereof), the data here indicated that the High-PEC preparation featured a higher mean number of E5 moieties per particle, which increased the stability of the object on the surface.

5.9.7 The experimental conditions impact the apparent stability of the coiled-coil complex

We then investigated the release behavior of E5-tagged objects from model polymeric surfaces, that is, 96-well plates covered with a low-fouling dextran matrix. K peptides were covalently immobilized on the dextran layer, using a vinyl sulfone linker for thiol coupling (see **Figure 5-2.A**). The surfaces were then incubated either with E5-tagged monomeric Red Fluorescent Protein (E5-RFP) or with E5-VEGF, and tested for immobilized protein density by fluorescence reading and ELISA, respectively. The concentrations were adjusted to obtain a similar response for E5-RFP incubated on the four K peptides (62 ± 3 relative fluorescence units, data not shown), and similarly for E5-VEGF on the four K peptides (62 ± 3 ELISA arbitrary units, data not shown). The overall nonspecific interaction of the proteins with the dextran matrix was negligible for most conditions (less than 4% of the specific signal in all cases but E5-VEGF on K5, see Supporting Information-Annexe A, **Figure annexe -7**), as expected (Noel et al., 2016), which confirmed that the proteins were mainly immobilized via coiled-coil interactions rather than adsorption (Murschel et al., 2015). The assay was similarly performed with E5-decorated particles, but the nonspecific interaction of

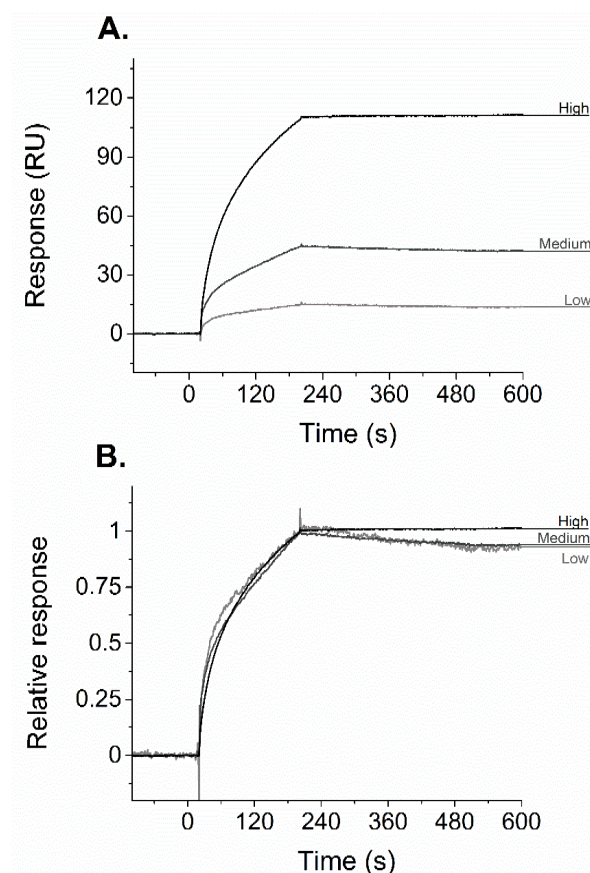


Figure 5-5 : Interaction of E5-decorated nanoparticles with the K5 peptide.

A set of nanoparticles with varying E5 surface densities was injected at 5 $\mu\text{g/mL}$ of PEI over ca. 100 RU of K5 peptides. The data are shown after double referencing, with the signal obtained from control nanoparticles with no E5 subtracted, (A) without or (B) after normalizing relatively to the local maximal response, $R/R(120\text{s})$.

the control particles was very high (data not shown), as observed with the biosensor chip (Supporting Information-Annexe A, **Figure annexe -6**), which rendered that experiment void.

The E5-RFP and E5-VEGF surfaces were then covered with PBS for the indicated duration, with buffer renewal on a daily basis, then surface protein density was assessed by fluorescence reading or ELISA. The data obtained over time are presented relative to the initial response in Figure 4. The signals on all surfaces decreased with time and reached $26 \pm 5\%$ for E5-RFP (**Figure 5-6.A**) and $80 \pm 4\%$ for E5-VEGF (**Figure 5-6.B**) of the initial value after seven days. In that

regard, the gap in release rates between a monomeric and a dimeric protein can be explained by the avidity difference, in good agreement with the results obtained by SPR biosensing (**Table 5-3**). Surprisingly though, when comparing the four K peptide-derivatized substrates, no clear differences in protein displacement were observed for both proteins. We mentioned above that the protein was immobilized by coiled-coil interactions only and not adsorbed on the dextran layer. Consequently, the high similarity of dissociation kinetics of the four K/E5-RFP complexes (similarly the four K/E5-VEGF complexes) is in stark contrast with previous observations made under continuous flow in SPR-based assays (see dissociation phases starting at 120 s for E5-EGF in the Supporting Information-Annexe A, **Figure annexe -2**, and for E5-VEGF, **Figure 5-4**).

The reduced incidence of L/A substitutions on protein release could be explained by the daily reach of a dynamic equilibrium in the semistatic conditions of the well-plates assays, whereas the dissociated protein was continuously depleted from the solution in the microfluidic chamber of the SPR instrument (Kumeria, Gulati, Santos, & Losic, 2013). Nonetheless, both experiments provided insight into the dynamics of K peptide/E5-proteins complex dissociation, be it for their use in semi-static conditions (e.g. in low-perfusion systems) or under continuous flow (e.g. in the lymphatic or vascular systems).

Overall, the present data emphasize the need for the careful design of experiments and the stringent interpretation of associated results, when studying protein-protein interactions and developing controlled release strategies. As shown here, the framework of the experiment can give rise to different interpretations, as we observed discrepancies between assays with diffusible proteins and assays with one partner immobilized (**Table 5-2** and discussion thereof), and also in static conditions when compared to continuous flow (**Figure 5-6** and discussion thereof). Other parameters may influence the kinetics of the interactions, including the lack of specificity since we observed the direct interaction of the nanoparticles with the dextran substrates (Supporting Information-Annexe A, **Figure annexe -6**). Furthermore, the 1:1 model of interaction, although convenient, may be inadequate to describe avidity phenomena (**Table 5-3** and discussion thereof) as well as monovalent interactions (Supporting Information-Annexe A, **Figure annexe -1**).

5.10 Conclusion

We have previously used E5/K5 coiled-coil interactions to decorate various biomaterials with biomolecules for tissue engineering and gene delivery applications. We here present three K5 variants with Leucine-to-Alanine substitutions as a means to tune the affinity and stability of the capture system. SPR-based assays demonstrated that the substitutions diminished the affinity of the E/K coiled-coil motif in a calculable and heptad-dependent fashion. When this control lever

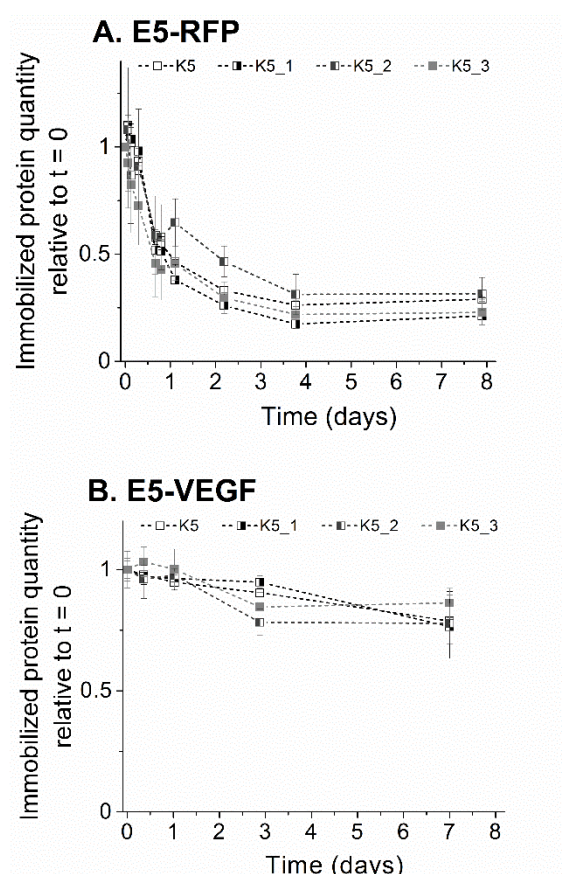


Figure 5-6 : Release of E5-tagged RFP and VEGF on 96-well microplates functionalized with K peptides.

Surfaces decorated with (A) monomeric E5-red fluorescent protein (RFP) and (B) dimeric E5-VEGF were incubated in PBS during 8 days, and the amount of protein on the surfaces was monitored by (A) fluorescence and (B) ELISA. Data are represented as the response relative to the response obtained immediately after incubation.

was combined with either the mono- or bivalent presentation of E5, using E5-tagged EGF or VEGF as models, respectively, a much wider range of dissociation constants could be reached (altogether from 0.1 pM to 270 nM). E5-decorated nanoparticles were also assayed by SPR, and both capture levels and release rates were affected by E5 surface densities. Altogether, the present study may guide the conception of coiled-coil based capture/release strategies, including growth factor decoration of biomaterials (e.g., with VEGF and PDGF for cardiovascular repair, EGF and FGF for wound healing or BMP and TGF- β for bone regeneration) and nanoparticle immobilization (e.g., polyplexes loaded with nucleic acid for gene therapy or liposomes for drug delivery). In that endeavor, we identified the key factors to consider when designing – and characterizing – these molecular systems. Those include peptide identity, density, valency and static/dynamic conditions.

5.11 Supporting information available

The Supporting information is available free of charge on the [ACS Publications website](https://pubs.acs.org) at DOI: [10.1021/acs.biomac.6b01830](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01830). SPR assays, ELISA controls, and the characterization of polyelectrolyte complexes by DLS ([PDF](#))²

5.12 Acknowledgements

This work was supported by the Canada Research Chair on Protein-enhanced Biomaterials (G.D.C.), by the Canada Research Chair in Applied Metabolic Engineering (M.J.), by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (G.D.C. and M.J.), by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (C.F. and F.M.), by the MEDITIS training program (C.F. and F.M.), by the Biomedical Science and Technology Research Group (C.F., G.D.C., F.M. and M.J.) and the John Stewart Endowed Chair in Peptide Chemistry to Robert S. Hodges. We thank Wendy Hartsock, Shaun Bevers and Colin Mant from the Biophysics Core Facility at the University of Colorado Denver, Anschutz Medical Campus, School of Medicine, for their exceptional technical support and fruitful discussion.

² Les données supplémentaires de cet article sont présentées dans l'Annexe A.

5.13 References

- Aronsson, C., Danmark, S., Zhou, F., Oberg, P., Enander, K., Su, H., & Aili, D. (2015). Self-sorting heterodimeric coiled coil peptides with defined and tuneable self-assembly properties. *Sci Rep*, 5 14063. doi: 10.1038/srep14063
- Assal, Y., Mizuguchi, Y., Mie, M., & Kobatake, E. (2015). Growth Factor Tethering to Protein Nanoparticles via Coiled-Coil Formation for Targeted Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 26(8), 1672-1677. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00266
- Banfi, A., von Degenfeld, G., Gianni-Barrera, R., Reginato, S., Merchant, M. J., McDonald, D. M., & Blau, H. M. (2012). Therapeutic angiogenesis due to balanced single-vector delivery of VEGF and PDGF-BB. *FASEB Journal*, 26(6), 2486-2497. doi: 10.1096/fj.11-197400
- Boucher, C., Ruiz, J. C., Thibault, M., Buschmann, M. D., Wertheimer, M. R., Jolicoeur, M., . . . De Crescenzo, G. (2010). Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions. *Biomaterials*, 31(27), 7021-7031. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.072
- Briquez, P. S., Clegg, L. E., Martino, M. M., Gabhann, F. M., & Hubbell, J. A. (2016). Design principles for therapeutic angiogenic materials. *Nature Reviews Materials*, 1(1), 15006. doi: 10.1038/natrevmats.2015.6
- Cao, L., & Mooney, D. J. (2007). Spatiotemporal control over growth factor signaling for therapeutic neovascularization. *Adv Drug Deliv Rev*, 59(13), 1340-1350. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.012
- De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry*, 42(6), 1754-1763. doi: 10.1021/bi0268450
- Donten, M. L., Hassan, S., Popp, A., Halter, J., Hauser, K., & Hamm, P. (2015). pH-jump induced leucine zipper folding beyond the diffusion limit. *Journal of Physical Chemistry B*, 119(4), 1425-1432. doi: 10.1021/jp511539c

Drogoz, A., David, L., Rochas, C., Domard, A., & Delair, T. (2007). Polyelectrolyte complexes from polysaccharides: formation and stoichiometry monitoring. *Langmuir*, 23(22), 10950-10958. doi: 10.1021/la7008545

Eisenberg, D., & McLachlan, A. D. (1986). Solvation energy in protein folding and binding. *Nature*, 319(6050), 199-203. doi: 10.1038/319199a0

Ferrara, N. (2010). Binding to the extracellular matrix and proteolytic processing: two key mechanisms regulating vascular endothelial growth factor action. *Molecular Biology of the Cell*, 21(5), 687-690. doi: 10.1091/mbc.E09-07-0590

Fletcher, J. M., Boyle, A. L., Bruning, M., Bartlett, G. J., Vincent, T. L., Zaccai, N. R., . . . Woolfson, D. N. (2012). A basis set of de novo coiled-coil peptide oligomers for rational protein design and synthetic biology. *ACS Synth Biol*, 1(6), 240-250. doi: 10.1021/sb300028q

Fortier, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2013). A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery. *Biomaterials*, 34(4), 1344-1353. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.047

Fortier, C., Louvier, E., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2015). Tailoring the Surface of a Gene Delivery Vector with Carboxymethylated Dextran: A Systematic Analysis. *Biomacromolecules*, 16(6), 1671-1681. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00221

Gerling-Driessen, U. I., Mujkic-Ninnemann, N., Ponader, D., Schone, D., Hartmann, L., Koks, B., . . . Hartmann, L. (2015). Exploiting Oligo(amido amine) Backbones for the Multivalent Presentation of Coiled-Coil Peptides. *Biomacromolecules*, 16(8), 2394-2402. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00634

Hamed, E., & Keten, S. (2014). Hierarchical cascades of instability govern the mechanics of coiled coils: helix unfolding precedes coil unzipping. *Biophysical Journal*, 107(2), 477-484. doi: 10.1016/j.bpj.2014.06.009

Hodges, R. S. (1996). Boehringer Mannheim award lecture 1995. La conference Boehringer Mannheim 1995. De novo design of alpha-helical proteins: basic research to medical applications. *Biochemistry and Cell Biology*, 74(2), 133-154. doi: 10.1139/o96-015

Jing, P., Rudra, J. S., Herr, A. B., & Collier, J. H. (2008). Self-assembling peptide-polymer hydrogels designed from the coiled coil region of fibrin. *Biomacromolecules*, 9(9), 2438-2446. doi: 10.1021/bm800459v

Kumeria, T., Gulati, K., Santos, A., & Losic, D. (2013). Real-time and in situ drug release monitoring from nanoporous implants under dynamic flow conditions by reflectometric interference spectroscopy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(12), 5436-5442. doi: 10.1021/am4013984

Litowski, J. R., & Hodges, R. S. (2001). Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils: the effect of chain length on protein folding, stability and specificity. *Journal of Peptide Research*, 58(6), 477-492. doi: 10.1034/j.1399-3011.2001.10972.x

Litowski, J. R., & Hodges, R. S. (2002). Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils. Effects of hydrophobicity and alpha-helical propensity on protein folding, stability, and specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37272-37279. doi: 10.1074/jbc.M204257200

Martino, M. M., Brkic, S., Bovo, E., Burger, M., Schaefer, D. J., Wolff, T., . . . Banfi, A. (2015). Extracellular matrix and growth factor engineering for controlled angiogenesis in regenerative medicine. *Front Bioeng Biotechnol*, 3 45. doi: 10.3389/fbioe.2015.00045

Mason, J. M., & Arndt, K. M. (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *ChemBioChem*, 5(2), 170-176. doi: 10.1002/cbic.200300781

Monera, O. D., Sereda, T. J., Zhou, N. E., Kay, C. M., & Hodges, R. S. (1995). Relationship of sidechain hydrophobicity and alpha-helical propensity on the stability of the single-stranded amphipathic alpha-helix. *Journal of Peptide Science*, 1(5), 319-329. doi: 10.1002/psc.310010507

Moran, L. B., Schneider, J. P., Kentsis, A., Reddy, G. A., & Sosnick, T. R. (1999). Transition state heterogeneity in GCN4 coiled coil folding studied by using multisite mutations and crosslinking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), 10699-10704. doi: 10.1073/pnas.96.19.10699

Murschel, F., Liberelle, B., St-Laurent, G., Jolicœur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2013). Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor. *Acta Biomaterialia*, 9(6), 6806-6813. doi: 10.1016/j.actbio.2013.02.032

Murschel, F., Zaimi, A., Noel, S., Jolicoeur, M., & De Crescenzo, G. (2015). Specific Adsorption via Peptide Tags: Oriented Grafting and Release of Growth Factors for Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 16(11), 3445-3454. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00955

Noel, S., Fortier, C., Murschel, F., Belzil, A., Gaudet, G., Jolicoeur, M., & De Crescenzo, G. (2016). Co-immobilization of adhesive peptides and VEGF within a dextran-based coating for vascular applications. *Acta Biomaterialia*, 37 69-82. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.043

O'Shea, E. K., Lumb, K. J., & Kim, P. S. (1993). Peptide 'Velcro': design of a heterodimeric coiled coil. *Current Biology*, 3(10), 658-667. doi: 10.1016/0960-9822(93)90063-T

Ozawa, C. R., Banfi, A., Glazer, N. L., Thurston, G., Springer, M. L., Kraft, P. E., . . . Blau, H. M. (2004). Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 113(4), 516-527. doi: 10.1172/JCI18420

Parry, D. A., Fraser, R. D., & Squire, J. M. (2008). Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure. *Journal of Structural Biology*, 163(3), 258-269. doi: 10.1016/j.jsb.2008.01.016

Pechar, M., Pola, R., Laga, R., Braunova, A., Filippov, S. K., Bogomolova, A., . . . Ulbrich, K. (2014). Coiled coil peptides and polymer-peptide conjugates: synthesis, self-assembly, characterization and potential in drug delivery systems. *Biomacromolecules*, 15(7), 2590-2599. doi: 10.1021/bm500436p

Pechar, M., Pola, R., Laga, R., Ulbrich, K., Bednarova, L., Malon, P., . . . Vanek, O. (2011). Coiled coil peptides as universal linkers for the attachment of recombinant proteins to polymer therapeutics. *Biomacromolecules*, 12(10), 3645-3655. doi: 10.1021/bm200897b

Riahi, N., Cappadocia, L., Henry, O., Omichinski, J., & De Crescenzo, G. (2016). Soluble expression, purification and functional characterization of a coil peptide composed of a positively charged and hydrophobic motif. *Amino Acids*, 48(2), 567-577. doi: 10.1007/s00726-015-2113-z

Robson Marsden, H., & Kros, A. (2010). Self-assembly of coiled coils in synthetic biology: inspiration and progress. *Angewandte Chemie. International Edition in English*, 49(17), 2988-3005. doi: 10.1002/anie.200904943

Schuck, P., & Zhao, H. (2010). The role of mass transport limitation and surface heterogeneity in the biophysical characterization of macromolecular binding processes by SPR biosensing. *Methods in Molecular Biology*, 627 15-54. doi: 10.1007/978-1-60761-670-2_2

Su, J. Y., Hodges, R. S., & Kay, C. M. (1994). Effect of chain length on the formation and stability of synthetic alpha-helical coiled coils. *Biochemistry*, 33(51), 15501-15510. doi: 10.1021/bi00255a032

Thomas, F., Boyle, A. L., Burton, A. J., & Woolfson, D. N. (2013). A set of de novo designed parallel heterodimeric coiled coils with quantified dissociation constants in the micromolar to sub-nanomolar regime. *Journal of the American Chemical Society*, 135(13), 5161-5166. doi: 10.1021/ja312310g

Tripet, B., Wagschal, K., Lavigne, P., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (2000). Effects of side-chain characteristics on stability and oligomerization state of a de novo-designed model coiled-coil: 20 amino acid substitutions in position "d". *Journal of Molecular Biology*, 300(2), 377-402. doi: 10.1006/jmbi.2000.3866

Tripet, B., Yu, L., Bautista, D. L., Wong, W. Y., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1996). Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain off the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. *Protein Engineering*, 9(11), 1029-1042. doi: 10.1093/protein/9.11.1029

Wang, T., Lau, W. L., DeGrado, W. F., & Gai, F. (2005). T-jump infrared study of the folding mechanism of coiled-coil GCN4-p1. *Biophysical Journal*, 89(6), 4180-4187. doi: 10.1529/biophysj.105.068809

Woolfson, D. N. (2005). The Design of Coiled-Coil Structures and Assemblies. Dans *Advances in Protein Chemistry* (vol. Volume 70, p. 79-112): Academic Press.

Xi, Z., Gao, Y., Sirinakis, G., Guo, H., & Zhang, Y. (2012). Single-molecule observation of helix staggering, sliding, and coiled coil misfolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5711-5716. doi: 10.1073/pnas.1116784109

CHAPITRE 6 ARTICLE 3 : SPECIFIC ADSORPTION VIA PEPTIDE TAGS: ORIENTED GRAFTING AND RELEASE OF GROWTH FACTORS FOR TISSUE ENGINEERING

Ce chapitre est dédié à l'[article](#) intitulé *Specific adsorption via peptide tags: Oriented grafting and release of growth factors for tissue engineering*, qui a été publié dans le journal *Biomacromolecules* en septembre 2015 (volume 16, numéro 11, pages 3445-3454). Il n'adresse pas un des objectifs spécifiques de cette thèse, tels que décrits dans le Chapitre 3, mais participe à l'avancement des connaissances quant à l'hypothèse technologique qui y est énoncée.

6.1 Résumé

Dans le domaine du génie tissulaire, de nombreuses stratégies de décoration de biomatériaux avec des facteurs de croissance ont été développées. Leur capacité à être mises en œuvre dans l'élaboration d'outils cliniques demeure cependant incertaine. Nous avons précédemment présenté deux peptides amphiphiles complémentaires, dénommés E5 et K5. Ces peptides, utilisés en tant qu'étiquettes de facteurs de croissance, ont permis de guider l'immobilisation de ces derniers sur des matériaux organiques par des interactions de type superhélice. Nous avons ici examiné leur potentiel à guider la capture des facteurs de croissance par adsorption physique. Des dosages immuno-enzymatiques ont mis en évidence que des interactions électrostatiques et hydrophobes interviennent dans l'immobilisation par adsorption, sans nuire à la capacité des peptides à former des interactions de type superhélice. En particulier, le facteur de croissance endothélial vasculaire étiqueté du peptide E5 a pu être adsorbé efficacement à du polystyrène fonctionnalisé avec du poly(allylamine), maintenu dans un état biologiquement actif et libéré progressivement sur une durée de plusieurs jours, avec une fuite initiale très limitée. Cette procédure d'immobilisation simple a été facilement transférée à des films de poly(éthylène téréphtalate). Nos données ont ainsi démontré que l'immobilisation surfacique de facteurs de croissance par le moyen d'une étiquette superhélice est une stratégie simple, polyvalente et contrôlable.

6.2 Header

SPECIFIC ADSORPTION VIA PEPTIDE TAGS: ORIENTED GRAFTING AND RELEASE OF GROWTH FACTORS FOR TISSUE ENGINEERING

Frederic Murschel,[†] Aldo Zaimi,[‡] Samantha Noel,[†] Mario Jolicoeur,[†] and Gregory De Crescenzo^{,†,‡}*

6.3 Author affiliations

[†]Department of Chemical Engineering and [‡]Institute of Biomedical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB), Bio-P2 Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal, QC, Canada H3C 3A7

*Corresponding author. E-mail address: gregory.decrescenzo@polymtl.ca.

6.4 Abstract

Numerous strategies have been proposed to decorate biomaterials with growth factors (GFs) for tissue engineering applications; their practicability as clinical tools remains however uncertain. We previously presented two complementary amphipathic peptides, namely, E5 and K5, which could be utilized as tags to direct GF capture onto organic materials via E5/K5 coiled-coil interactions. We here investigated their potential as mediators of GF physical adsorption. Enzyme-linked immunosorbent assays highlighted that both electrostatic and hydrophobic interactions could contribute to the adsorption process, without interfering with the peptides propensity for coiled-coil interactions. E5-tagged vascular endothelial growth factor, in particular, was efficiently adsorbed to poly(allylamine)-functionalized polystyrene, was maintained in a bioactive state and was steadily liberated over several days with little initial burst. This simple immobilization procedure was successfully applied to poly(ethylene terephthalate) films. Altogether, our data demonstrated that coil-tag-directed adsorption is a tunable, versatile and straightforward strategy to decorate biomaterials with GFs.

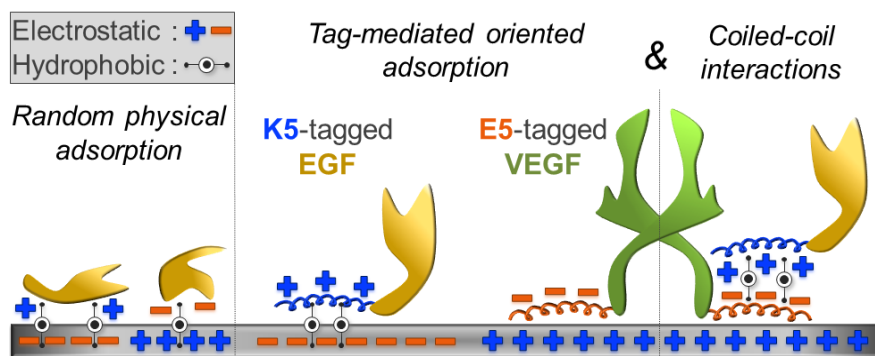


Figure 6-1 : Graphical abstract.

6.5 Keywords

Adsorption, amphipathic, coiled-coil, electrostatic, tag, VEGF.

6.6 Introduction

Interfacial properties are a primary concern for all materials that are intended to interact with or made of biological components. In biomedical applications, in particular tissue engineering and regenerative medicine (TERM), adequate surface functionalization becomes more pressing as the biological elements gain in complexity: from in vitro stem cell amplification on two-dimensional polymers (Celiz et al., 2014; Konagaya, Kato, Nakaji-Hirabayashi, & Iwata, 2011) to whole tissue growth on three-dimensional scaffolds meant for in vivo implantation. To design efficient TERM products, one can try and mimic the natural processes involved in tissue development and/or harness the natural capacity for regeneration of living tissues. In this context, a plethora of delicately balanced and coordinated cues are provided by the extracellular matrix (ECM), cell-cell junctions as well as signaling molecules, especially growth factors (GFs) that affect cell adhesion, migration, differentiation and proliferation (Carmeliet & Jain, 2011; Joddar & Ito, 2011; Place, E. S., Evans, & Stevens, 2009). In particular, the spatial and temporal distribution of GFs, that is, their bioavailability, strongly affects cell fate (Samorezov & Alsberg, 2015; Vempati, Popel, & Mac Gabhann, 2014). Controlling that bioavailability remains however a challenge, which has hampered the development of therapeutic angiogenesis (Carmeliet & Jain,

2011) and has in turn limited the commercialization of TERM materials for thick and vascularized tissues (Place, E. S. et al., 2009).

Many strategies rely on the use of ECM components to directly affect cell behavior and/or sequester GFs within a biomaterial until a proper environmental cue triggers their release (Johnson & Wang, 2013; Tada, Kitajima, & Ito, 2012). For instance, vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, a prime mediator of blood vessel formation, has been tethered to heparin-coated surfaces through its heparan sulphate-binding domain (Melchiorri et al., 2015). As for the ECM-stored isoforms *in vivo*, tethered VEGF may then be released upon addition of soluble heparin or heparinase, or cleaved by plasmin or matrix metalloproteinases into fully diffusible and bioactive fragments (Vempati et al., 2014). Other strategies for biomaterials decoration have been carried out by harnessing the natural ability of GFs to bind to cell surface receptors (Belair, Khalil, Miller, & Murphy, 2014), by involving native residues or linked glycans in covalent and/or electrostatic interactions (Melchiorri et al., 2015; Sharon & Puleo, 2008), by encapsulation (Place, L. W., Sekyi, & Kipper, 2014) as well as by physical adsorption (Joddar & Ito, 2011). Importantly, “there is not one systematic approach and/or universal regenerative solution” (Place, E. S. et al., 2009), with each strategy bearing its own advantages and limits. Covalent immobilization enables the sequestration of the GF for an extended period of time, but raises the concern of overstimulating the cells as well as keeping the biomolecule in a functionally active state. Indeed, covalent grafting is either performed in a non-oriented fashion, which may abrogate GF interactions with cell surface receptor; or in an oriented fashion that requires harsh conditions, which may impact GF folding and thus bioactivity (Gomes et al., 2012; Joddar & Ito, 2011). Conversely, encapsulation enables the sustained release of bioactive GFs, but most approaches require chemical modifications to diminish loss from an initial burst (Gomes et al., 2012). Similarly, physical adsorption raises the issue of denaturation and loss of bioactivity upon capture and has seemed so far inappropriate for controlled release applications, in particular regarding the initial burst (Gomes et al., 2012; Joddar & Ito, 2011).

We have previously reported the site-specific immobilization of the human epidermal and vascular endothelial growth factors (EGF and VEGF₁₆₅, respectively) via α -helical coiled-coil interactions, more precisely by using the high affinity binding of the 5-heptad-long peptide (EVSALEK)₅ or E5 to its engineered partner: (KVSALKE)₅ or K5 (Boucher, Ruiz, et al., 2010; Murschel et al., 2013). In these studies, EGF and VEGF were produced as chimeras, i.e. E5-tagged

EGF and VEGF, as well as K5-tagged EGF (namely, E5-EGF, E5-VEGF and K5-EGF, respectively). We then demonstrated on multiple substrates that the initial grafting of a K5 layer enabled substrate decoration with high levels of bioactive E5-tagged proteins. As serendipity would have it, we discovered that, in some cases, the costly and time-consuming preparation of a covalent K5 peptide layer was not necessary to capture the tagged proteins efficiently. These so far unpublished results showed that the surface deposition of the tagged GFs was highly specific when compared to their untagged counterparts, and thus indicative of a coil-tag-driven adsorption process. The purpose of this manuscript is to further investigate this phenomenon, provide a thorough characterization of the processes at hand, explore its versatility and demonstrate its significance for facile GF decoration of TERM products.

6.7 Materials

Linear poly(allylamine) (PAAm, 25 kDa) was obtained from Polysciences, Inc. (Warrington, PA). Sodium hydroxide (NaOH, 99.3% purity), hydrochloric acid (HCl, 37.7% v/v), ethanol (EtOH, 99.9% purity) and dioxane (99+% purity) were obtained from VWR International, Ltd. (Mont-Royal, QC). Cells and media were purchased from Lonza (Walkersville, MD). Fetal bovine serum and phalloidin Alexa 488 were obtained from Life Technologies Inc. (Burlington, ON). Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), bovine serum albumin (BSA), sodium chloride (99.99% purity), resazurin sodium salt, Dabco, Orange II sodium salt (92% purity), Toluidine Blue O, N-hydroxysuccinimide (NHS), ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and potassium chloride (KCl, 99+% purity) were purchased from Sigma–Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON). Formaldehyde was purchased from ACP Chemical, Ltd. (Whittle Parkway, UK). Commercially available untagged EGF and hVEGF₁₆₅, corresponding antibodies and ELISA DuoSet kits were purchased from R&D systems (Minneapolis, MN). Peptides and proteins were synthesized and characterized as previously described (Boucher, Ruiz, et al., 2010; Murschel et al., 2013). Untreated polystyrene (PS), CellBIND (CB), Costar High-Binding (CostarHB), PureCoat microplates and CellBIND flasks for adherent cell culture were obtained from Corning Inc. (Corning, NY). Polyethylene terephthalate (PET) was obtained as a 50- μ m thick film from Goodfellow Cambridge Ltd. (Huntingdon, UK). MilliQ grade water (18.2 M Ω ·cm, referred to here as water) was generated with a Millipore Gradient A 10 purification system (Etobicoke, ON). All absorbance and fluorescence measurements were carried out on a Victor V Multilabel Counter

from PerkinElmer Inc. (Woodbridge, ON). All reactions, incubations and washing steps were carried out at room temperature using Dulbecco's phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) as diluent, unless otherwise specified.

6.8 Methods

6.8.1 Surface amination

Covalent grafting of PAAm on carboxylated 96-well CB microplates (Pardo et al., 2005) was performed by carbodiimide chemistry for 16 h (380 μ M PAAm, 40 mM NHS, 10 mM EDC in 100 mM MES buffer, pH 4.7). The surfaces, namely, CB-PAAm, were then washed with water, ethanol and water. Adsorption of PAAm on pristine PS was performed similarly, except that the PAAm solution was not supplemented with NHS or EDC and that the surfaces, namely, PS-PAAm, were washed three times with water. PAAm grafting on 1-cm diameter PET films was performed by aminolysis, as reported with poly(vinylamine), to obtain PET-PAAm (Noel et al., 2013). Aminated surfaces were stored in water at 4°C until further use.

6.8.2 Surface characterization

Positive (respectively negative) surface groups were quantified by colorimetric assays adapted from the literature (Noel, Liberelle, Robitaille, & De Crescenzo, 2011; Tiraferri & Elimelech, 2012). Surfaces were incubated with 40 mM Orange II in 5 mM HCl in water (respectively 100 μ M Toluidine Blue O in 2 mM NaOH in water) for 1 h at 40°C, then rinsed 5 times with the diluent. The electrostatically bound dye was desorbed in 50 mM NaOH in water (respectively acetic acid:water 1:1) and quantified by absorbance reading at 490 nm (respectively 630 nm).

6.8.3 Growth factor capture and quantification

Fifty-microliter protein solutions diluted with BSA (1% w/v) were incubated for 1 h in microplates. Surfaces were then washed three times. Quantification of immobilized protein was performed by a direct ELISA: 1 h incubation of biotinylated anti-VEGF₁₆₅ or anti-EGF antibodies,

20 min incubation of horseradish peroxidase-streptavidin conjugate, 10 min incubation of the substrate solution. Substrate oxidation was monitored for 10 min by repetitious absorbance readings at 630 nm. Absorbance slopes (unit: 10^{-3} absorbance unit·s⁻¹) were compiled and are referred to as arbitrary units in the manuscript. A similar procedure was applied to PET films using 100 μ L drops of solutions. After peroxidase incubation, the films were transferred in a PS 48-well plate and covered with 250 μ L substrate solution. For coiled-coil interaction studies, surfaces were incubated with 1 μ M K5 peptides in PBS (respectively 4 nM E5-VEGF in PBS-BSA), rinsed, covered with a wide range of E5-EGF (respectively K5-EGF) concentrations then tested for the presence of EGF (respectively both EGF and VEGF) by ELISA.

6.8.4 Growth factor displacement

K5-EGF and E5-VEGF solutions were prepared at a concentration of 4 nM with BSA then stored at -20°C in aliquots. For each indicated time-point, an aliquot was thawed and protein capture was carried out as described above. Following washes, proteins were covered with 100 μ L desorption solutions (FBS, CBB, BSA, NaCl or Tween-20 in PBS + antibiotics) and placed in a humidified, 5%-enriched CO₂ incubator at 37°C for the indicated duration. Desorption solutions were renewed after 48 h, when applicable. All samples were simultaneously quantified by direct ELISA, as described above.

6.8.5 Cell culture and protein activity assays

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were maintained in a humidified, 5%-enriched CO₂ incubator at 37°C, using EGM-2 (complete) medium and used between passages 5 and 8. Cells were seeded in complete medium on GF-functionalized wells in microplates, at an equivalent density of 40 000 cells·cm⁻². After 3 h, cells were rinsed twice then tested for mitochondrial metabolic activity (MA) or further incubated with 50 μ L of 0.5% v/v FBS-supplemented basal medium for proliferation assays. After 48 h, cells were rinsed then tested for MA. MA was measured by covering surfaces with resazurin (9 μ g/mL in complete medium). Resazurin reduction to resorufin by living cells was monitored by fluorescence readings at 531/595 nm (excitation/emission) every 30 min for 2 h, and fluorescence slopes (unit: relative fluorescent units·min⁻¹) were compiled. The same procedure was applied to PET films placed in a PS 48-well

plate, except that the cell seeding was an equivalent of $30\,000\text{ cells}\cdot\text{cm}^{-2}$ and that $250\text{ }\mu\text{L}$ of medium and reagents were used. When indicated, 2 nM VEGF in solution was used as positive control.

6.8.6 Fluorescence microscopy

Following MA assay on PET films, cells were fixed with formaldehyde (3.7% v/v) for 30 min and permeabilized with Triton X-100 (0.4% v/v) for 10 min. Non-specific adsorption sites were blocked with BSA (1% w/v) during 1 h, then a $50\text{ }\mu\text{L}$ drop of phalloidin Alexa 488 (2.5% v/v) was deposited on each film. After 50 min of incubation, $5\text{ }\mu\text{L}$ of DAPI ($20\text{ }\mu\text{g/mL}$) was added. After 10 more minutes, the samples were extensively rinsed and mounted on glass slides with Dabco (4 mg/mL in PBS:glycerol 1:9). Pictures were taken under a 365 nm excitation for DAPI and 470 nm excitation for phalloidin, using an AX10 Imager from Carl Zeiss Microscopy (Peabody, MA).

6.8.7 Data treatment

All data are represented as the mean value \pm standard deviation of three independent assays ($N = 3$) performed at least with three samples ($n \geq 3$), except for coiled-coil interaction studies ($N = 1$; $n = 3$). When indicated, statistical analysis was carried out by independent two-sample t test with equal variances. Cell response data are represented as relative to the minimal (value = 0) and maximal (value = 1) responses with cells in medium without growth factor and cells in complete medium, respectively.

6.9 Results and discussion

6.9.1 Adsorption of coil-tagged growth factors onto polystyrene-based plates: contribution of electrostatic interactions

Five different proteins were incubated in phosphate buffered saline (PBS pH 7.4) using bovine serum albumin (BSA) as diluent, over 6 different polystyrene-based 96-well plates. On the one hand, the proteins at hand were: native human EGF, E5-tagged EGF, K5-tagged EGF, native human VEGF₁₆₅ and E5-tagged VEGF₁₆₅. Interestingly, EGF, the E5 moiety and BSA are all

anionic at physiological pH, whereas VEGF and the K5 moiety are globally cationic in PBS (see pI values, **Table 6-1**). On the other hand, the plates used in the study were: pristine polystyrene (PS), poly(allylamine)-decorated PS (PS-PAAm), CellBIND (CB), poly(allylamine)-functionalized CB (CB-PAAm), Costar High-Binding (CostarHB) and PureCoat microplates, which surface charges were quantified by colorimetric assays (see **Table 6-2**). PS-PAAm, CB-PAAm and PureCoat featured a high majority of positive charges (e.g. amino groups) whereas negative charges (e.g. carboxyl groups) were predominant in CB microplates as well as PS, although their density was very low for the latter ($0.7 \text{ pmol}\cdot\text{mm}^{-2}$). A similar albeit low amount of both negative and positive charges was detected on CostarHB. After protein incubation at concentrations ranging from 0.1 to 10 nM, the resulting GF densities were analyzed by ELISA (**Figure 6-2** and **Table 6-2**).

K5-EGF, E5-VEGF and untagged VEGF were strongly recruited onto CB microplates (**Figure 6-2.C**). Given that the K5 tag and VEGF are positively charged at physiological pH whereas the CB surface is negative, as above-mentioned, the adsorption of K5-EGF, VEGF and E5-VEGF was indicative of electrostatic interactions between the proteins or tag and the plate. The results are in good agreement with the literature reporting VEGF capture on carboxylated tissue culture polystyrene plates (Holmberg, Hansen, Lind, & Hjort, 2012) and on negatively charged polysaccharides such as sulfated chitosan (Yu, Y. et al., 2015). Oppositely, neither EGF nor E5-EGF induced an ELISA response higher than the noise level on any surface. It is here worth noticing that bovine serum albumin (BSA) was used as diluent to prevent loss of proteins during handling and to promote a better orientation of the recruited proteins, as previously described for Tween-20 (Kumada, Shiritani, Hamasaki, Ohse, & Kishimoto, 2009). BSA, EGF and the E5 tag being all anionic at physiological pH, the excess amount of albumin most certainly prevented EGF and E5-EGF from being captured on positive surfaces through electrostatic interactions (Mohan et al., 2014). Conversely, E5-VEGF incubation induced ELISA responses drastically higher than those of VEGF on CostarHB, PS-PAAm, CB-PAAm and PureCoat, i.e. all surfaces bearing positive charges (**Figure 6-2.B,D-F**; by at least 36-fold in area under curve values, **Table 6-2**). On these surfaces, the adsorption of E5-VEGF was only in turn attributed to an avidity phenomenon triggered by the presence of two E5 moieties on the dimeric chimera (Murschel et al., 2013), which was sufficient to overcome the interactions between BSA and the positive surface charges of the plates.

We further investigated the behavior of K5-EGF when adsorbed onto CB (**Figure 6-2.C**) and of E5-VEGF when adsorbed onto CB-PAAm (**Figure 6-2.D**), as they were the protein/plate combinations with the highest coil tag-driven adsorption rate, as indicated by AUC values of ELISA responses (**Table 6-2**).

Table 6-1 : Protein and peptide physical parameters.

protein/peptide	parameter ^a		
	MW (kDa)	theoretical pI	aliphatic index
E5, (EVSALEK) ₅	3.8	4.47 ^b	111.43
K5, (KVSALKE) ₅	3.8	9.82 ^b	111.43
BSA (P02769, res. 25-607) ^c	66.4	5.60	76.14
EGF (Q6QBS2) ^c	6.2	4.78	71.70
E5-EGF	12.3	5.35	71.59
K5-EGF	12.6	7.27	69.74
VEGF ^d (P15692, res. 27-191) ^c	19.0	9.01 ^e	51.33
E5-VEGF ^d	25.9	6.31 ^e	54.42

^aFrom the ExPASy ProtParam tool: molecular weight (MW), theoretical isoelectric point (pI) and aliphatic index (relative volume occupied by aliphatic side chains). ^bThe value may not be reliable for small proteins/peptides. ^cProtein accession number in the UniProt database and chosen subsequence for parameter computation. ^dMonomeric non glycosylated VEGF and E5-tagged VEGF. ^eThe value may not be reliable for glycosylated proteins.

Table 6-2 : Effect of the surface chemistry of polystyrene-based 96-well plates on the adsorption specificity of native and coil-tagged growth factors.

		plate					
		PS	PS-PAAm	CB-PAAm	PureCoat	CB	CostarHB
surface charge	density of positive groups (pmol·mm ⁻²) ^a	0.0 ± 0.3	3.2 ± 0.6	16 ± 3	24 ± 7	0.1 ± 0.2	1.0 ± 0.5
	density of negative groups (pmol·mm ⁻²) ^b	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.3	1.7 ± 0.7	8.7 ± 0.5	1.4 ± 0.3
protein capture	threshold concentration ^c (TC, nM)	EGF	•	•	•	•	•
		E5-EGF	•	•	•	•	•
		K5-EGF	•	•	•	0.19 ± 0.05	1.5 ± 0.2
		VEGF	•	•	•	< 0.1	•
		E5-VEGF	•	2.1 ± 0.6	0.13 ± 0.04	0.5 ± 0.1	0.28 ± 0.07
	area under curve ^d (AUC, a.u.)	EGF	•	•	•	•	•
		E5-EGF	•	•	1.1 ± 0.4	•	1.3 ± 0.7
		K5-EGF	•	•	2.0 ± 0.4	35 ± 7	13 ± 2
		VEGF	•	•	•	92 ± 2	•
		E5-VEGF	•	9 ± 4	52 ± 9	28 ± 2	106 ± 8

^aDensity of positively charged groups determined by Orange II assays at pH 3. ^bDensity of negatively charged groups determined by Toluidine Blue O assays at pH 10. ^cMinimal concentration to induce an ELISA response of 5 arbitrary units (3 times the cutoff index). ^dArea under curve (AUC) calculated using the trapezoidal rule (concentrations: nM, log; ELISA response: a.u., linear). • Not determined: TC superior to 10 nM or negative AUC values.

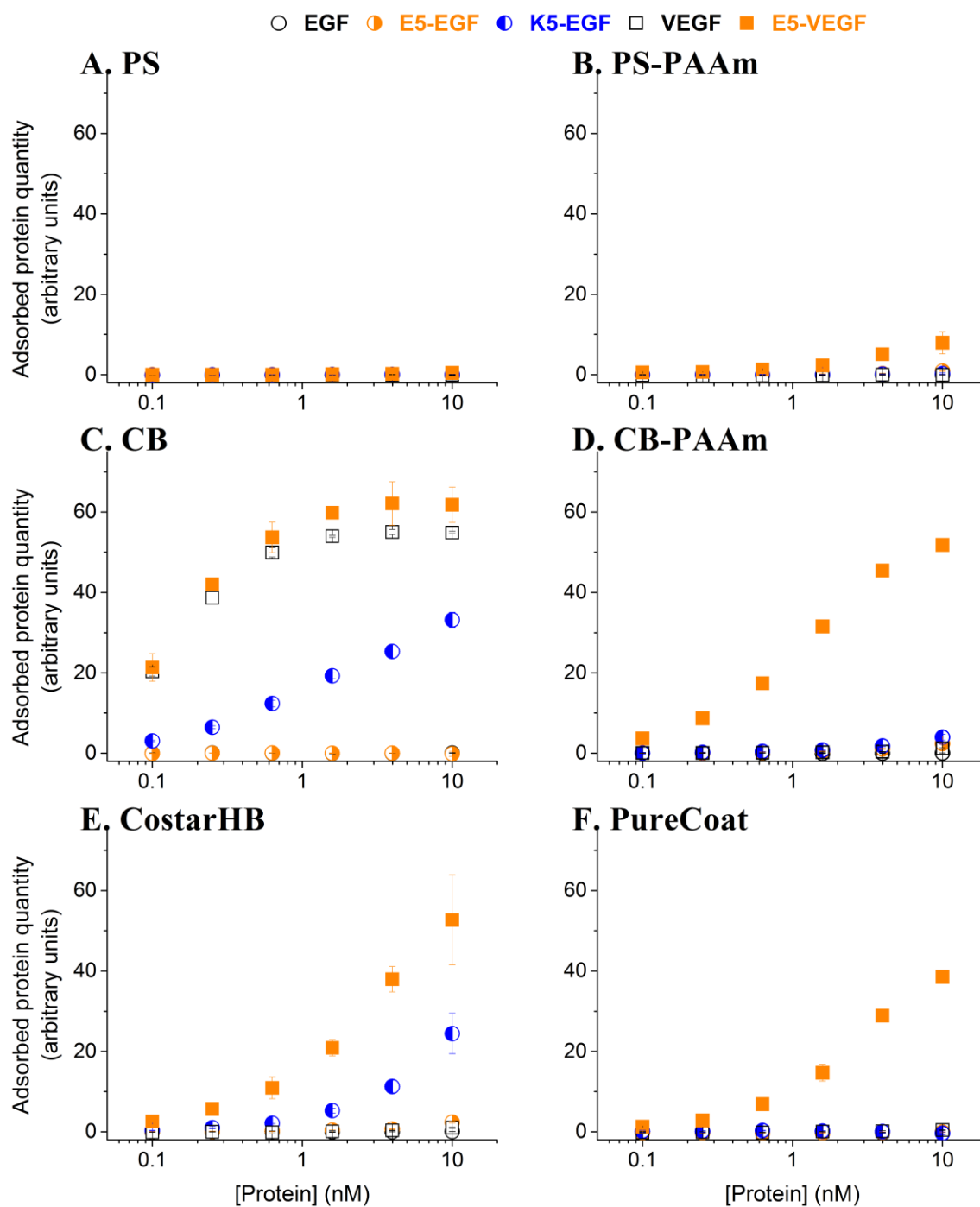


Figure 6-2 : Adsorption of native and tagged proteins over (A) pristine and (B) PAAm-modified polystyrene, (C) pristine and (D) PAAm-modified CellBIND, (E) Costar High-Binding, and (F) PureCoat microplates (namely, PS, PS-PAAm, CB, CB.-PAAm, CostarHB, and PureCoat), as monitored by ELISA.

6.9.2 Displacement of adsorbed coil-tagged growth factors by salt and proteins: contribution of electrostatic and hydrophobic interactions

A non-saturating concentration of K5-EGF (respectively E5-VEGF) was incubated in CB (respectively CB-PAAm) microplates. After rinsing, the wells were filled with PBS supplemented with various competing agents for 48 h. Surfaces were then rinsed thoroughly to remove any traces of the competing agents and final surface protein quantity was assessed by ELISA (**Figure 6-3**).

The levels of both coil-tagged proteins decreased with increasing NaCl concentration. More precisely, the ELISA signal for E5-VEGF dropped by 78% after 48 h with 5 M NaCl, whereas the corresponding decline was very modest for K5-EGF on CB (13%, **Figure 6-3.A**). This was most likely due to the screening of electrostatic interactions only, that is, the release of K5-EGF or E5-VEGF in presence of sodium chloride, and not protein denaturation given that NaCl is a mild chaotropic agent (Metrick & MacDonald, 2015). This interpretation is consistent with that of Holmberg and colleagues on poly(histidine)-tagged proteins: all tagged proteins could be recruited on tissue culture polystyrene solely via electrostatic imidazole/carboxyl groups interactions that were impeded by over 75% when incubated with as little as 0.8 M NaCl (Holmberg et al., 2012). Accordingly, the data confirmed that electrostatic interactions – between the glutamic acid residues of the E5 tag and the primary amino groups of poly(allylamine) (PAAm) – were at the core of the adsorption process for E5-VEGF on CB-PAAm. Conversely, the lower sensitivity to NaCl of K5-EGF adsorbed on CB suggested that mere electrostatic interactions – between the lysine residues of K5 and the carboxyl groups of CB – could not fully account for K5-mediated EGF behavior.

Significant decrease in ELISA signals after 48 h was also observed for both K5-EGF and E5-VEGF when using protein-based agents (CBB, FBS and BSA, **Figure 6-3.B**). It is here noteworthy that the response of the immunosorbent assay is a qualitative description of the amount of GFs accessible to ELISA antibodies. The here-observed decline could thus be attributed to several phenomena, in particular: (i) the denaturation or enzymatic cleavage of the GFs, (ii) the adsorption of proteins on immobilized GFs, which could interfere in their recognition by ELISA antibodies and/or (iii) the release of the GFs from the surface. First, given that the results were reported relative to an incubation in PBS and that the samples were enzyme-free – at least for BSA being a highly pure solution and for FBS that was heat-inactivated before use, the first hypothesis was not considered a valid explanation for the differences depicted in **Figure 6-3.B**. Second, it

cannot be excluded that a secondary layer of adsorbed proteins, be it albumin, casein or serum proteins, could have formed on top of the GFs. However, multilayer adsorption has seldom been reported for proteins with a molecular weight lower than 200 kDa, which was predominantly the

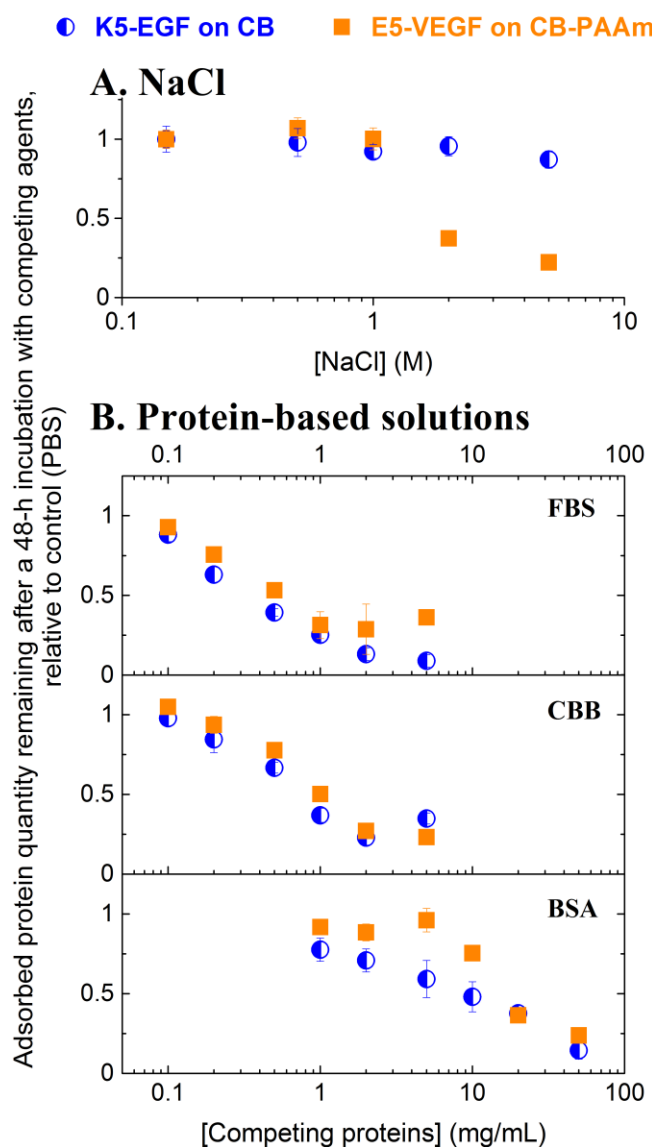


Figure 6-3 : Sodium chloride and protein solutions trigger K5-EGF and E5-VEGF release.

Effect of (A) sodium chloride, (B) fetal bovine serum (FBS), casein-based blocking buffer (CBB), and bovine serum albumin (BSA) concentration on E5-VEGF desorption from CB-PAAm and K5-EGF desorption from CB. Data are represented as ELISA response after 48 h relative to the response obtained with proteins incubated in diluent only (PBS).

case for the proteins in BSA, CBB and FBS solutions (protein distribution was observed by polyacrylamide gel electrophoresis, data not shown). More, even if a secondary layer were to be formed, its stability would most likely be too low to resist the washes that were performed before incubating the ELISA antibodies (Vogler, 2012). Altogether, the third hypothesis, that is, the release of the GFs from the surface, was the most likely cause of the decrease in ELISA signals pictured in **Figure 6-3.B**. This liberation or displacement was most likely due to the protein-based agents competing with the amphipathic E5 or K5 tags for surface charges, as previously suggested, as well as for hydrophobic groups at the very surface of the microplate (Mohan et al., 2014). Interestingly, XPS analysis indicated that a significant proportion of phenyl groups were detected on the CB plasma-treated surface (Pardo et al., 2005) – a remnant of the pristine polystyrene – whereas the subsequent amination procedure efficiently hindered their detection on CB-PAAm (“shake-up” peaks of 2.0% and 0.6% at. of the C1s peak, respectively, Supporting Information **Figure annexe -8** and **Table annexe -1**). As far as K5-EGF is concerned, the main mediator of its K5-driven adsorption on CB could be hydrophobic interactions – between leucine and/or valine side chains of the K5 peptide and the phenyl groups on the CB surface – whereas the same side chains on the E5 peptide had no match on the CB-PAAm surface. This hypothesis was further tested by incubating E5-EGF on CB surfaces with a much lower concentration of competing BSA (0.0001% vs. 0.1% w/v): in this case a strong and specific capture was observed when compared to untagged EGF (respective threshold concentrations, as described in **Table 6-2**, of 0.42 nM and > 10 nM, data not shown). These data emphasized the existence of interplay between aliphatic residues and surface aromatic groups that could overcome a globally unfavorable charge repartition. Interestingly, K5-EGF adsorbed on CB was not displaced by a 48-h immersion in 1% v/v Tween-20, a non-ionic detergent capable of disrupting hydrophobic interactions ($100 \pm 3\%$ of the control, data not shown). The fact that neither Tween-20 nor NaCl had a noticeable effect on the desorption of K5-EGF from CB were strong indicators of a synergistic effect provided by the amphipathic K5 peptide and the amphipathic CB surface. It is here worth noticing that all of the results that were obtained on CB microplates could also be indicative of cation- π interactions between the lysine side-chains of the E5 or the K5 peptide and the phenyl groups at the CB surface (Dougherty, 2013).

We further assessed the involvement of both electrostatic and amphipathic residues in the peptide/surface interaction by testing adsorbed K5 and E5 for coiled-coil interactions.

6.9.3 Tag adsorption compatibility with coiled-coil interactions

E5-EGF (respectively K5-EGF) and untagged EGF were incubated over K5-decorated CB (respectively E5-VEGF-decorated CB-PAAm) microplates. After rinsing, the resulting protein densities were analyzed by ELISA (**Figure 6-4**). E5-EGF capture and K5-EGF adsorption were not detected over bare CB (**Figure 6-4.A**) and CB-PAAm (**Figure 6-4.B**), respectively, as expected (see **Figure 6-2**). Both E5-EGF on K5-decorated CB and K5-EGF on E5-VEGF-decorated CB-PAAm induced a strong ELISA response, whereas untagged EGF showed no capture on either surface.

The assay thus indicated that immobilization of a protein that featured no affinity for the bare surface was only possible if both E5 and K5 peptides were in play, i.e., via coiled-coil interactions. This leads to the conclusion that the coil peptides either adopted an α -helical conformation upon adsorption, which would be in good agreement with Apte and colleagues' report on lysine and leucine-rich peptides (Apte, Collier, Latour, Gamble, & Castner, 2010), or retained sufficient flexibility following adsorption to spontaneously rearrange into α -helices when facing their partner. Nevertheless, since E5-VEGF bears two E coil moieties, it cannot be excluded that one was involved in surface adsorption while the second was responsible for K5-EGF capture (**Figure 6-4.B**). The same reasoning can be applied to the K5 peptides – CGG(KVSALKE)₅ – that were used in this experiment. The latter indeed possessed a N-terminal cysteine residue that could cause homodimerization through disulfide-bond formation, and thus one K5 moiety could be adsorbed on the surface while the second could be responsible for E5-EGF capture (**Figure 6-4.A**). Interestingly, no decrease of E5-VEGF density (as measured by ELISA) was observed although high levels of K5-EGF were obtained (see filled squares, **Figure 6-4.B**), which suggests that K5-EGF recruitment by the E5 tags did neither hinder VEGF bioavailability nor triggered its release. The stability and release over time of both GFs was further examined in cell culture conditions, that is, by incubating them with FBS, a recurrent cell culture medium supplement.

6.9.4 GF release in cell culture conditions

Adsorbed K5-EGF and E5-VEGF were incubated for up to 4 days in cell culture conditions, that is, in a humidified incubator at 37°C, with PBS supplemented with antibiotics and FBS concentrations ranging from 0 to 5 % v/v. Wells were then rinsed and surface protein quantity was

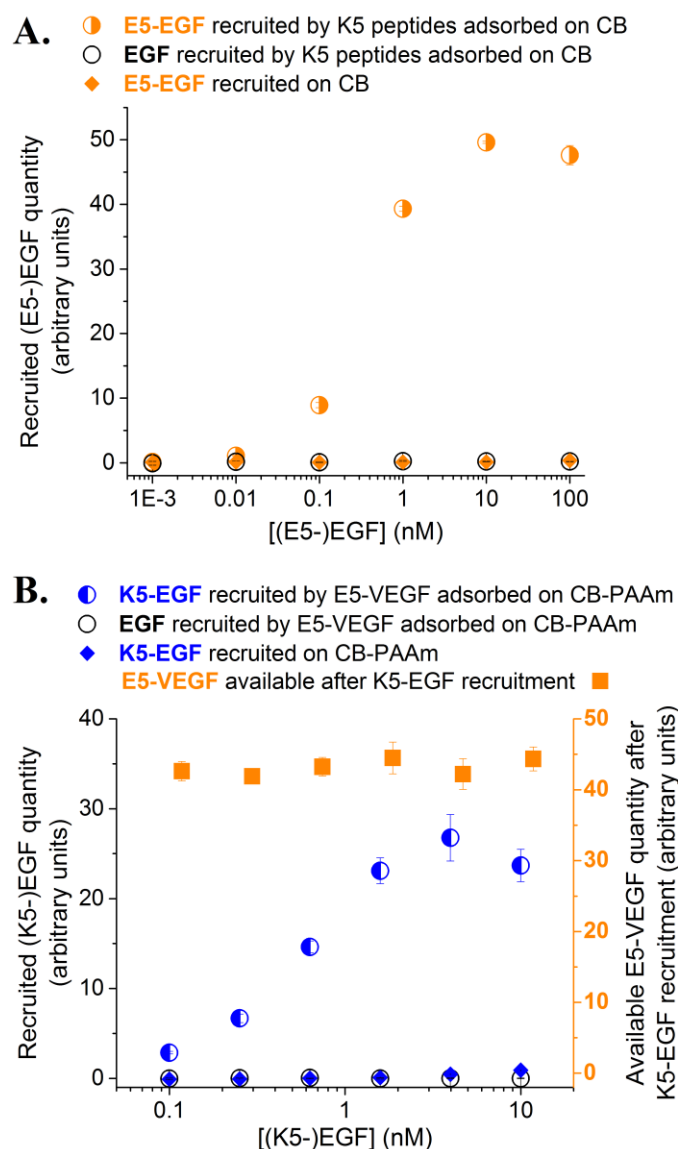


Figure 6-4 : Coil-tag-mediated adsorption is compatible with coiled-coil-mediated recruitment of a secondary recruitment.

Incubation and specific capture of (A) E5-EGF by K5 peptides adsorbed on CB and of (B) K5-EGF by E5-VEGF adsorbed on CB-PAAm, monitored by ELISA in 96-well plates.

assessed by ELISA (**Figure 6-5**). The ELISA signals for both proteins decreased with increasing concentrations of FBS in solution, which indicates that they were increasingly displaced from the surface, as previously mentioned (**Figure 6-3** and the discussion thereof). At the highest FBS concentration tested, K5-EGF suffered from a dramatic burst release within the first 3 h ($91 \pm 1\%$,

Figure 6-5.B), as is often the case for proteins that are non-covalently bound to a material (Culpepper, Bonvallet, Reddy, Ponnazhagan, & Bellis, 2013; Reed & Wu, 2014), whereas E5-VEGF release was very moderate in the same time frame ($18 \pm 8\%$, **Figure 6-5.A**). The displacement of both GFs then carried on at a much slower rate for 45 h, reaching respectively $57 \pm 6\%$ and $69 \pm 14\%$ of the value obtained after the initial burst. A slight change in behavior was observed for both growth factors between 48 h and 96 h, which was attributed to the renewal of medium for the last time point only.

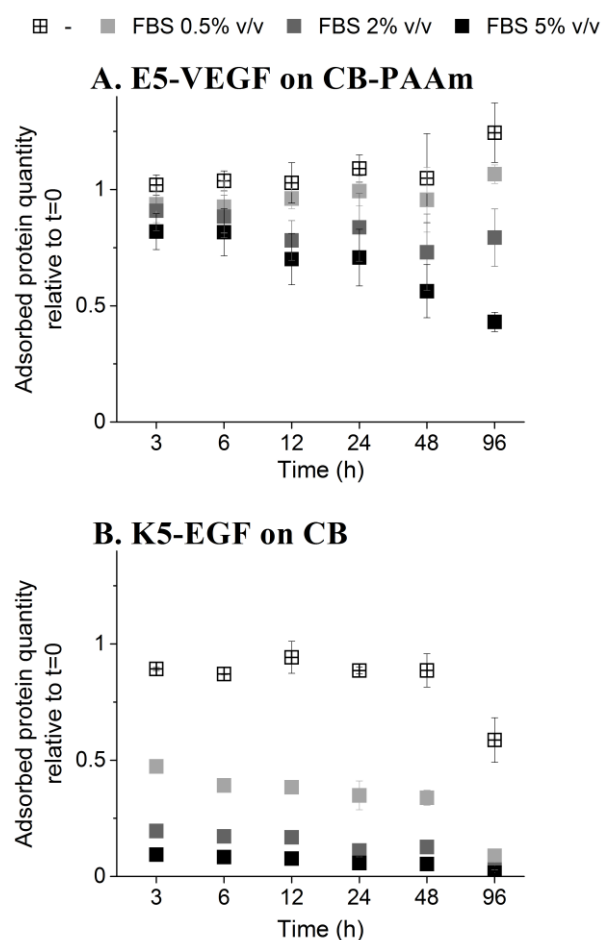


Figure 6-5 : FBS concentration mediates the release of adsorbed growth factors over time.

Effect of duration and FBS concentration on the displacement of (A) E5-VEGF from CB-PAAm and (B) K5-EGF from CB 96-well plates in cell culture conditions. Data are represented as ELISA response relative to the response obtained with a freshly thawed and incubated protein solution.

As indicated by previous results (**Figure 6-3**), the K5-EGF/CB interaction presumably involved both hydrophobic (and/or cation- π) and electrostatic interactions, causing this GF to be more prone to displacement by serum proteins than E5-VEGF adsorbed on CB-PAAm. Altogether, the data illustrated the versatility of the tag-mediated adsorption of GFs in respect to their release rate, which could be modulated via the number of coil tags and/or the material surface. Our constructs could be stored in PBS with little loss for several days before being either gradually released in response to the presence of serum, as it is the case for E5-VEGF adsorbed on CB-PAAm, or made swiftly available as indicated by the burst release of K5-EGF adsorbed on CB. Of interest, the behavior of adsorbed E5-VEGF indicated that coil tag-mediated adsorption of bioactive molecules on biomaterials could become a powerful alternative to their encapsulation, the frequent limitation of which is an initial burst release that can be detrimental to proper tissue growth (Gomes et al., 2012). We consequently focused on that GF and, more precisely, investigated whether E5-VEGF retained biological activity when adsorbed on aminated substrates.

6.9.5 Endothelial cell proliferation triggered by adsorbed E5-VEGF

Chemically inert poly(ethylene terephthalate) films were aminolysed with PAAm for 24 h at 70°C to obtain aminated PET, namely, PET-PAAm. A primary amino group density of $56 \pm 6 \text{ pmol} \cdot \text{mm}^{-2}$ was reached on the films, which was in the same order of magnitude as the density obtained on CB-PAAm (**Table 6-2**). After rinsing, the films were incubated with various concentrations of VEGF or E5-VEGF and protein density was assessed by ELISA (Supporting Information, **Figure annexe -9**). The tagged chimera showed considerably higher levels of adsorption on PET-PAAm when compared to pristine PET, or to untagged VEGF incubated on PET-PAAm. The data therefore demonstrated a specific E5-mediated capture of the protein by the PAAm coating of PET films, similarly to PAAm-coated CB microplates (**Figure 6-2.B**).

For biological activity assays, primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were seeded on either CB-PAAm or PET-PAAm films previously decorated with E5-VEGF at concentrations ranging from 0.5 to 100 nM. The cells were allowed to adhere for 3 h, then either probed for metabolic activity (MA) to determine adhesion levels or further cultivated for 48 h in 0.5% v/v FBS-supplemented basal medium (**Figure 6-6**). On both substrates, the adhesion levels were unaffected by the protein density (data not shown). After 48 h, the normalized response of

HUVECs increased with the amount of E5-VEGF used for surface preparation, be it on CB-PAAm (**Figure 6-6.A**) or PET-PAAm (**Figure 6-6.B**). Relative cell proliferation over 10 nM and 100 nM pre-incubated E5-VEGF on PET films (16 ± 7 and $47 \pm 6\%$, respectively) was in excellent agreement with the results obtained in CB-PAAm microplates (15 ± 4 and $44 \pm 7\%$, respectively). E5-VEGF was therefore shown to retain strong biological activity after E5-mediated adsorption,

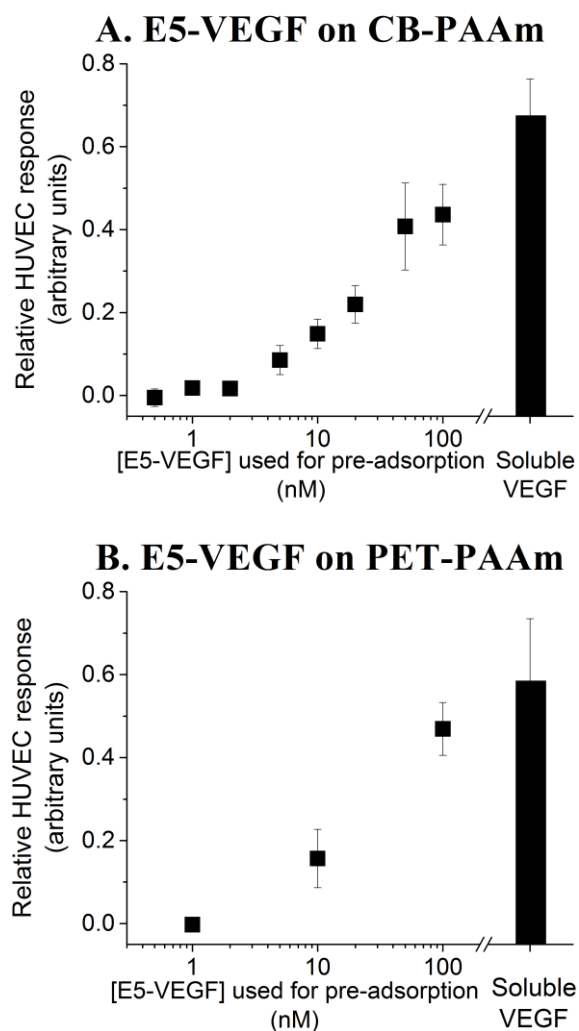


Figure 6-6 : E5-VEGF adsorbed on aminated microplates and PET films retains bioactivity.

HUVEC proliferation in basal medium supplemented with 0.5% v/v FBS (A) in 96-well CB-PAAm plates and (B) on PET-PAAm films decorated with various densities of E5-VEGF, monitored by metabolic activity assays after 48 h. Data are represented as assay response relative to the response obtained with cells in complete medium and in basal medium with 0.5% v/v FBS.

and the translation of our immobilization strategy from a model PS-based microplate to a relevant tissue engineering substrate (PET is indeed used for vascular implants) was proven to be successful.

It is here noteworthy that in 0.5% v/v FBS-supplemented basal medium, HUVECs that were not exposed to VEGF, be it adsorbed or diffusible, appeared to be quiescent: MA values after 48 h on PET films stagnated at $99 \pm 17\%$ of the activity measured immediately after adhesion (data not shown). It could be inferred that adsorbed E5-VEGF did not enhance but triggered cell division. Interestingly, the concentration of FBS employed here was insufficient to trigger substantial release of E5-VEGF (**Figure 6-5**), which also suggests that the presentation of immobilized E5-VEGF, both in terms of orientation and availability, enabled appropriate recognition by its cognate receptors on the cell surface without requiring release in the cell culture medium. This hypothesis was supported by cultivating cells on E5-VEGF-decorated CB-PAAm using basal medium (0% FBS, pro-apoptotic conditions (Murschel et al., 2013)) and evaluating VEGF-induced survival via a MA assay. Even though no release of the growth factor was to be expected at all in the buffer, the cells were indeed rescued by adsorbed E5-VEGF (see Supporting Information, **Figure annexe -10**).

Proliferating cells were further observed under a fluorescence microscope at 48 h: cells were fixed, stained for actin filaments and nuclei, and then photographs of a representative area were taken (**Figure 6**). Apparent cell number was consistent with the MA results: HUVEC density was higher on E5-VEGF than on BSA-covered (**Figure 6-7.B-10x** and **Figure 6-7.A-10x**, respectively). Close-up pictures indicated that cells were more spread and contacts between neighboring cells were more numerous on E5-VEGF than on BSA (**Figure 6-7.B-40x** and **Figure 6-7.A-40x**, respectively). On BSA, cells were neither shrinking nor well spread, which is consistent with the previously suggested state of quiescence. Interestingly, there were no significant differences between HUVECs seeded on 100 nM E5-VEGF-functionalized films and HUVECs presented with diffusible VEGF ($p = 0.3$ for MA results, **Figure 6-6**, and overall similar coverage of the film, **Figure 6-7.B** and **Figure 6-7.C**). Altogether, adsorbed E5-VEGF unambiguously triggered healthy HUVEC proliferation in 0.5% v/v FBS-supplemented medium, be it on a model polystyrene-based system or a more relevant tissue engineering substrate, without the need for its release and to an extent comparable to diffusible VEGF.

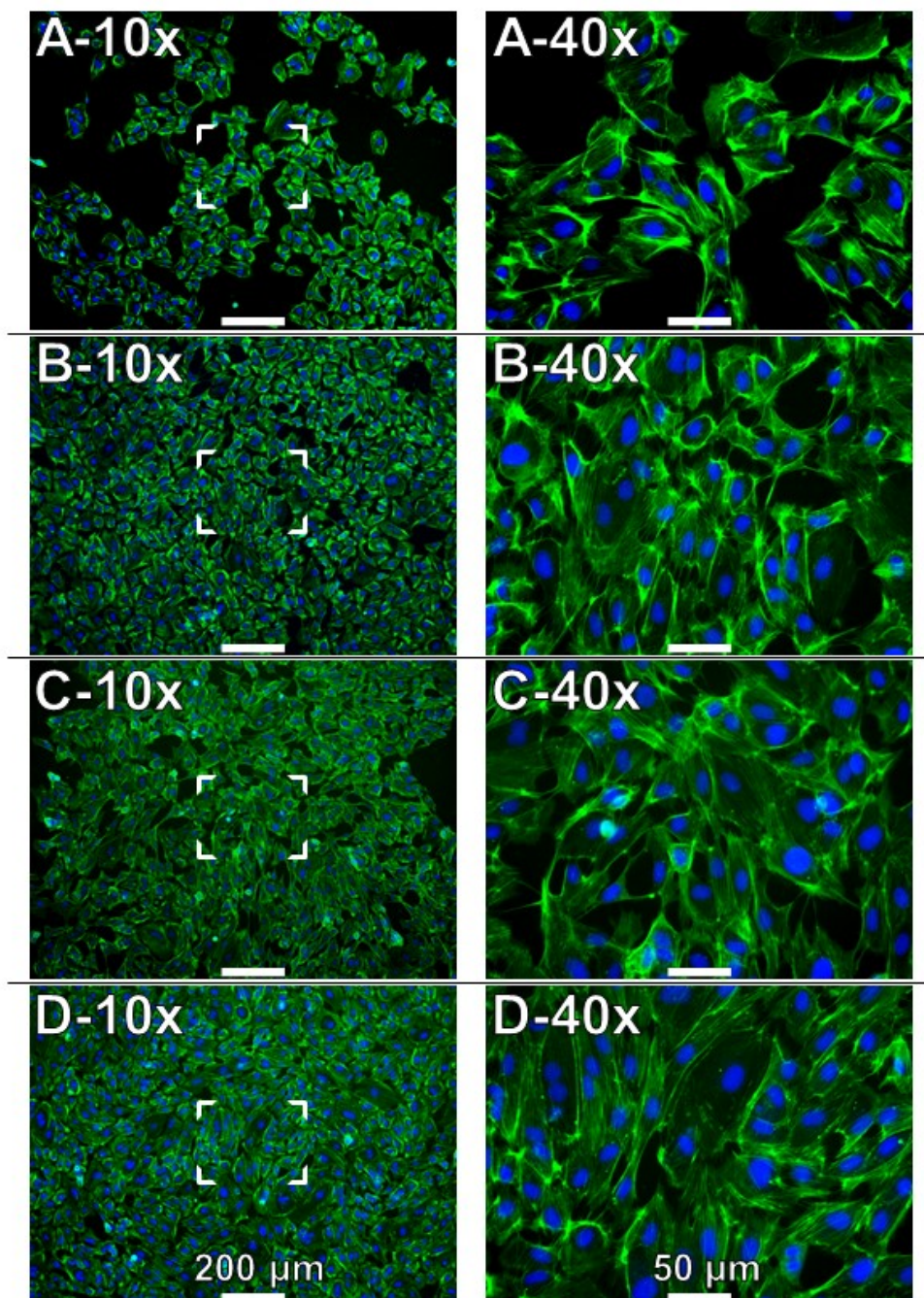


Figure 6-7 : E5-VEGF adsorbed on PET – PAAm films promotes HUVEC proliferation.

HUVEC proliferation on PET – PAAm films incubated with (B) 100 nM E5-VEGF or (A, C, D) diluent only, in basal medium supplemented with (A, B) 0.5% v/v FBS, (C) 0.5% v/v FBS and 2 nM diffusible VEGF, or (D) in complete medium. After 48 h, cells were fixed, stained for actin (phalloidin, green) and nuclei (DAPI, blue), and pictures were taken at the center of one representative film for each condition.

As stated by Place and colleagues, “there is a danger, by over-engineering devices, of making their translation to clinical use unlikely” (Place, E. S. et al., 2009). In that endeavor, engineered peptides and tag-fused GF chimeras have emerged as a promising alternative to native GFs for the decoration of biomaterials: the former should facilitate site-specific conjugation and should thus provide superior control on orientation as well as on retention/release kinetics than the latter (Tada et al., 2012). Tag-mediated immobilization can involve the formation of a covalent bond, e.g., between a cysteine-containing tag and a thiol-reactive substrate (Backer et al., 2006), or be based on biorecognition between pairs of biomolecules: biotin and avidin (Zhang, X. et al., 2012), metal ions and poly(histidine) (Konagaya et al., 2011) or two heterodimeric coiled-coil partners (Assal et al., 2015; Boucher, Ruiz, et al., 2010) to name but a few. More recently, the use of peptidic tags designed to trigger protein adsorption has risen as an interesting avenue (i) to lower the stringency on material surface requirements, by diminishing time and costs related to surface preparation, (ii) to facilitate scale-up and clinical translation as well as (iii) to increase versatility (Care, Bergquist, & Sunna, 2015; Culpepper et al., 2013; Holmberg et al., 2012; Konagaya et al., 2011; Kumada et al., 2009). Our work on coil tag-mediated adsorption was strongly motivated by these multiple potential benefits.

(i) Accordingly, the here described method is very simple: a single-step incubation of the GFs is sufficient for their specific and oriented capture onto a pristine or mildly pre-functionalized surface – simple amination procedure, no chemical or biological linker required. The yield of GF sequestration to the surface may also be readily enhanced by selecting a more appropriate diluent or by adjusting its concentration to minimize competition with E5 or K5 adsorption (see discussion on **Figure 6-2** and **Figure 6-3**).

(ii) Culpepper and colleagues reported poly(glutamic acid) tags for the electrostatic immobilization of a bone morphogenic protein-2 derivative on both hydroxyapatite and allograft bone in vitro, a strategy that was translated in vivo with ease (Culpepper et al., 2013). Likewise, the method for E5-VEGF adsorption on model CB-PAAm microplates was successfully applied to PET-PAAm films, with remarkably similar results in terms of GF levels and bioactivity (**Figure 6-6** and **Figure 6-7**). Moreover, adsorbed E5-VEGF featured modest to no burst release and gradual release over several days in the presence of serum proteins (**Figure 6-5**), which is a major advantage for adequate tissue formation in vivo.

(iii) Interestingly, most of the microplates we assayed can be decorated with a GF, either via an E5 or a K5 tag (**Figure 6-2**). We attributed this striking versatility to the amphiphilic structure of the peptides that enabled both hydrophobic and electrostatic interactions with surface chemical groups. The use of amphiphilic peptide tags to direct protein adsorption on hydrophilic PS had previously been reported by Kumada et al., as they identified RIIIRRIIR, namely, PS19-6, as a prime choice for high-affinity binding to those surfaces (Kumada et al., 2009). The potency of this strongly amphipathic nonapeptide was later substantiated by Konagaya and colleagues, who successfully immobilized an EGF-RIIIRRIIR chimera onto hydrophilic PS supports to direct stem cell amplification in vitro (Konagaya et al., 2011). As opposed to PS19-6, E5 and K5 shared the unique propensity to spontaneously form coiled-coil interactions, a propensity that was surprisingly not thwarted by their adsorption (**Figure 6-4**). Consequently, our study not only paves the way for the immobilization of multiple coil-tagged molecules on biomaterials but also for their precise colocalization. This could prove very useful to target specific receptor/co-receptor complexes, thus initiating selected signaling pathways (Crafts, Jensen, Blocher-Smith, & Markel, 2015), and enabling the fine direction of cell fate.

6.10 Conclusion

We here report the decoration of biomaterials with growth factors through the use of amphipathic coil tags. ELISAs performed in several polystyrene-based multi-well plates with various surface properties gave insight into the immobilization process, with electrostatic and hydrophobic interactions contributing to the tag-mediated adsorption of the growth factors. Dimeric E5-tagged VEGF emerged from the screening as a relevant candidate for the decoration of biomaterials, with high levels of capture on aminated multi-well plates and gradual release lasting several days in the presence of serum. E5-VEGF was successfully immobilized via the same method on poly(allylamine)-modified poly(ethylene terephthalate) films, and was then shown to promote endothelial cell proliferation. The presented strategy for growth factor immobilization features several key advantages over current techniques, including high versatility and easy implementation.

6.11 Supporting information available

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: [10.1021/acs.bio-mac.5b00955](https://doi.org/10.1021/acs.bio-mac.5b00955). Characterization of PS, CB, and CB-PAAm plates by X-ray photoelectron spectrometry and the survival of endothelial cells on CB-PAAm.³

6.12 Notes

The authors declare no competing financial interest.

6.13 Acknowledgments

This work was supported by the Canada Research Chair on Protein-Enhanced Biomaterials (G.D.C.), by the Canada Research Chair in Applied Metabolic Engineering (M.J.), by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (G.D.C., M.J. and A.Z.), by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (F.M., S.N.), by the MEDITIS training program (F.M.) and by the Biomedical Science and Technology Research Group (G.D.C., M.J. and F.M.). We are thankful to Josianne Lefèbvre for technical support and fruitful discussion.

6.14 References

- Apte, J. S., Collier, G., Latour, R. A., Gamble, L. J., & Castner, D. G. (2010). XPS and ToF-SIMS investigation of alpha-helical and beta-strand peptide adsorption onto SAMs. *Langmuir*, 26(5), 3423-3432. doi: 10.1021/la902888y
- Assal, Y., Mizuguchi, Y., Mie, M., & Kobatake, E. (2015). Growth Factor Tethering to Protein Nanoparticles via Coiled-Coil Formation for Targeted Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 26(8), 1672-1677. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00266
- Backer, M. V., Patel, V., Jehning, B. T., Claffey, K. P., & Backer, J. M. (2006). Surface immobilization of active vascular endothelial growth factor via a cysteine-containing tag. *Biomaterials*, 27(31), 5452-5458. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.025

³ Les données supplémentaires de cet article sont présentées dans l'Annexe B.

Belair, D. G., Khalil, A. S., Miller, M. J., & Murphy, W. L. (2014). Serum-dependence of affinity-mediated VEGF release from biomimetic microspheres. *Biomacromolecules*, 15(6), 2038-2048. doi: 10.1021/bm500177c

Boucher, C., Ruiz, J. C., Thibault, M., Buschmann, M. D., Wertheimer, M. R., Jolicoeur, M., . . . De Crescenzo, G. (2010). Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions. *Biomaterials*, 31(27), 7021-7031. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.072

Care, A., Bergquist, P. L., & Sunna, A. (2015). Solid-binding peptides: smart tools for nanobiotechnology. *Trends in Biotechnology*, 33(5), 259-268. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.02.005

Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298-307. doi: 10.1038/nature10144

Celiz, A. D., Smith, J. G., Langer, R., Anderson, D. G., Winkler, D. A., Barrett, D. A., . . . Alexander, M. R. (2014). Materials for stem cell factories of the future. *Nature Materials*, 13(6), 570-579. doi: 10.1038/nmat3972

Crafts, T. D., Jensen, A. R., Blocher-Smith, E. C., & Markel, T. A. (2015). Vascular endothelial growth factor: therapeutic possibilities and challenges for the treatment of ischemia. *Cytokine*, 71(2), 385-393. doi: 10.1016/j.cyto.2014.08.005

Culpepper, B. K., Bonvallet, P. P., Reddy, M. S., Ponnazhagan, S., & Bellis, S. L. (2013). Polyglutamate directed coupling of bioactive peptides for the delivery of osteoinductive signals on allograft bone. *Biomaterials*, 34(5), 1506-1513. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.046

Dougherty, D. A. (2013). The cation-pi interaction. *Accounts of Chemical Research*, 46(4), 885-893. doi: 10.1021/ar300265y

Gomes, S., Leonor, I. B., Mano, J. F., Reis, R. L., & Kaplan, D. L. (2012). Natural and Genetically Engineered Proteins for Tissue Engineering. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 1-17. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.07.003

Holmberg, M., Hansen, T. S., Lind, J. U., & Hjorto, G. M. (2012). Increased adsorption of histidine-tagged proteins onto tissue culture polystyrene. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 92(0), 286-292. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.12.001

Joddar, B., & Ito, Y. (2011). Biological modifications of materials surfaces with proteins for regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry*, 21(36), 13737-13755. doi: 10.1039/c1jm10984g

Johnson, N. R., & Wang, Y. (2013). Controlled delivery of heparin-binding EGF-like growth factor yields fast and comprehensive wound healing. *Journal of Controlled Release*, 166(2), 124-129. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.11.004

Konagaya, S., Kato, K., Nakaji-Hirabayashi, T., & Iwata, H. (2011). Design of culture substrates for large-scale expansion of neural stem cells. *Biomaterials*, 32(4), 992-1001. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.008

Kumada, Y., Shiritani, Y., Hamasaki, K., Ohse, T., & Kishimoto, M. (2009). High biological activity of a recombinant protein immobilized onto polystyrene. *Biotechnology Journal*, 4(8), 1178-1189. doi: 10.1002/biot.200800192

Melchiorri, A. J., Hibino, N., Yi, T., Lee, Y. U., Sugiura, T., Tara, S., . . . Fisher, J. P. (2015). Contrasting biofunctionalization strategies for the enhanced endothelialization of biodegradable vascular grafts. *Biomacromolecules*, 16(2), 437-446. doi: 10.1021/bm501853s

Metrick, M. A., & MacDonald, G. (2015). Hofmeister ion effects on the solvation and thermal stability of model proteins lysozyme and myoglobin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 469(0), 242-251. doi: 10.1016/j.colsurfa.2015.01.038

Mohan, T., Niegelhell, K., Zarth, C. S., Kargl, R., Kostler, S., Ribitsch, V., . . . Stana-Kleinschek, K. (2014). Triggering protein adsorption on tailored cationic cellulose surfaces. *Biomacromolecules*, 15(11), 3931-3941. doi: 10.1021/bm500997s

Murschel, F., Liberelle, B., St-Laurent, G., Jolicœur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2013). Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor. *Acta Biomaterialia*, 9(6), 6806-6813. doi: 10.1016/j.actbio.2013.02.032

Noel, S., Liberelle, B., Robitaille, L., & De Crescenzo, G. (2011). Quantification of primary amine groups available for subsequent biofunctionalization of polymer surfaces. *Bioconjugate Chemistry*, 22(8), 1690-1699. doi: 10.1021/bc200259c

Noel, S., Liberelle, B., Yogi, A., Moreno, M. J., Bureau, M. N., Robitaille, L., & De Crescenzo, G. (2013b). A non-damaging chemical amination protocol for poly(ethylene

terephthalate) - application to the design of functionalized compliant vascular grafts. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(2), 230-238. doi: 10.1039/c2tb00082b

Pardo, A. M. P., Bryhan, M., Krasnow, H., Hardin, N., Riddle, M., LaChance, O., . . . Hoover, D. S. (2005). Corning CellBIND Surface: An Improved Surface for Enhanced Cell Attachment. Technical Report. Corning Incorporated Life Sciences, Acton (MA): Tiré de http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/Media/pdf/t_CellBIND_Improved_Surface_CLS_AN_057.pdf

Place, E. S., Evans, N. D., & Stevens, M. M. (2009). Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature Materials*, 8(6), 457-470. doi: 10.1038/nmat2441

Place, L. W., Sekyi, M., & Kipper, M. J. (2014). Aggrecan-mimetic, glycosaminoglycan-containing nanoparticles for growth factor stabilization and delivery. *Biomacromolecules*, 15(2), 680-689. doi: 10.1021/bm401736c

Reed, S., & Wu, B. (2014). Sustained growth factor delivery in tissue engineering applications. *Annals of Biomedical Engineering*, 42(7), 1528-1536. doi: 10.1007/s10439-013-0956-6

Samorezov, J. E., & Alsberg, E. (2015). Spatial regulation of controlled bioactive factor delivery for bone tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 84(0), 45-67. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.018

Sharon, J. L., & Puleo, D. A. (2008). Immobilization of glycoproteins, such as VEGF, on biodegradable substrates. *Acta Biomaterialia*, 4(4), 1016-1023. doi: 10.1016/j.actbio.2008.02.017

Tada, S., Kitajima, T., & Ito, Y. (2012). Design and synthesis of binding growth factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), 6053-6072. doi: 10.3390/ijms13056053

Tiraferri, A., & Elimelech, M. (2012). Direct quantification of negatively charged functional groups on membrane surfaces. *Journal of Membrane Science*, 389(0), 499-508. doi: 10.1016/j.memsci.2011.11.018

Vempati, P., Popel, A. S., & Mac Gabhann, F. (2014). Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(1), 1-19. doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.11.002

Vogler, E. A. (2012). Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials*, 33(5), 1201-1237. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.059

Yu, Y., Chen, J., Chen, R., Cao, L., Tang, W., Lin, D., . . . Liu, C. (2015). Enhancement of VEGF-Mediated Angiogenesis by 2-N,6-O-Sulfated Chitosan-Coated Hierarchical PLGA Scaffolds. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(18), 9982-9990. doi: 10.1021/acsami.5b02324

Zhang, X., Shi, X., Li, J., Hu, Z., Zhou, D., Gao, J., & Tan, W. (2012). A novel therapeutic vaccine of mouse GM-CSF surface modified MB49 cells against metastatic bladder cancer. *Journal of Urology*, 187(3), 1071-1079. doi: 10.1016/j.juro.2011.10.126

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

7.1 Objectif 1 : production et caractérisation d'E5-VEGF

7.1.1 Sous-objectif *i* : production d'E5-VEGF

Comme indiqué dans les sous-sections 4.7.4 et 4.8.2, la production de la chimère a été réalisée par transfection transitoire en fiole agitée de cellules mammifères HEK293, au moyen d'un plasmide et de protocoles développés au sein du CNRC – installations avenue Royalmount, puis purifiée par chromatographie d'affinité. Les rendements globaux ont été dans l'ordre de grandeur attendu pour cette plateforme, soit $15 \pm 6 \text{ mg.L}^{-1}$ de culture, et le produit final n'a pas présenté d'agrégats. Le processus sélectionné s'est montré adéquat pour les études menées en laboratoire, mais nécessiterait une amélioration significative pour l'utilisation de la chimère à l'échelle clinique ou industrielle.

Afin d'augmenter le rendement de production, la plateforme par transfection transitoire en fiole agitée pourrait être révisée au profit d'une culture en bioréacteur et/ou au moyen d'une lignée mammifère exprimant la chimère de manière stable. La production par voie bactérienne pourrait également être considérée : en effet, l'état de glycosylation de VEGF n'influence pas son activité biologique (cf section 2.1.2.1). L'approche bactérienne nécessiterait cependant de réviser en profondeur le processus de purification afin d'obtenir une protéine non agrégée et correctement repliée.

Le procédé de purification employé a présenté un rendement faible, en moyenne $35 \pm 8\%$, dû particulièrement à des pertes après l'étape de chromatographie d'affinité (voir **Figure 7-1.A**). Des essais à petite échelle ont cependant révélé un rendement supérieur à 75%, sans autre changement que la quantité de surnageant injecté (voir **Figure 7-1.B**). Ces résultats indiquent que la manipulation du surnageant et/ou les conditions de chargement d'une production totale, soit le volume et la quantité de matière, sont des paramètres-clefs à investiguer pour améliorer cette étape.

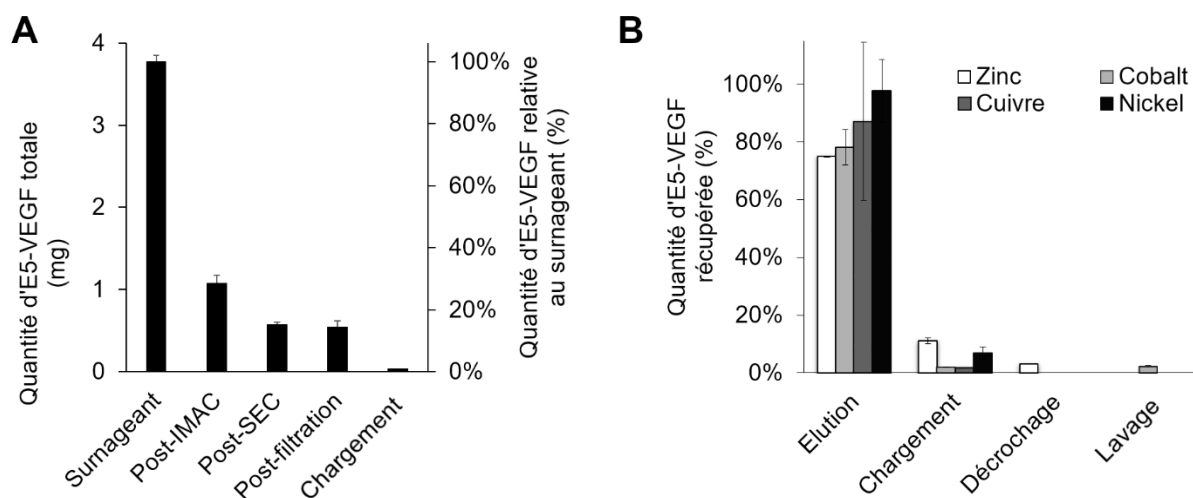


Figure 7-1 : Rendements des étapes de purification d'E5-VEGF mesurés par ELISA.

(A) Pertes d'E5-VEGF au cours des étapes de purification d'une production de 500 mL : surnageant de culture, élution de chromatographie d'affinité (IMAC), élution de chromatographie d'exclusion par la taille (SEC), filtration stérile à 0,2 µm. « Chargement » renvoie à la quantité d'E5-VEGF ayant fui durant le chargement d'IMAC. (B) Quantités d'E5-VEGF récupéré après IMAC en utilisant divers ions métalliques divalents, dans des essais à petite échelle.

7.1.2 Sous-objectif ii : activité biologique d'E5-VEGF en solution

Portion VEGF

Tel qu'indiqué dans les sections 4.8.3 et 4.8.4, la capacité de la portion VEGF de la chimère à interagir avec VEGF-R1 et VEGF-R2 et à stimuler des cellules endothéliales a été démontrée lorsqu'en solution. De façon intéressante, le test de survie des cellules modèles (HUVEC) a révélé une activité très proche de celle de VEGF natif (EC_{50} de 0.39-0.47 et 0.6-0.7 nM, respectivement). L'on pourra noter que le choix s'est orienté sur un test de survie en conditions pro-apoptotiques par commodité, car c'est en l'absence totale de sérum que l'effet de VEGF est apparu le plus

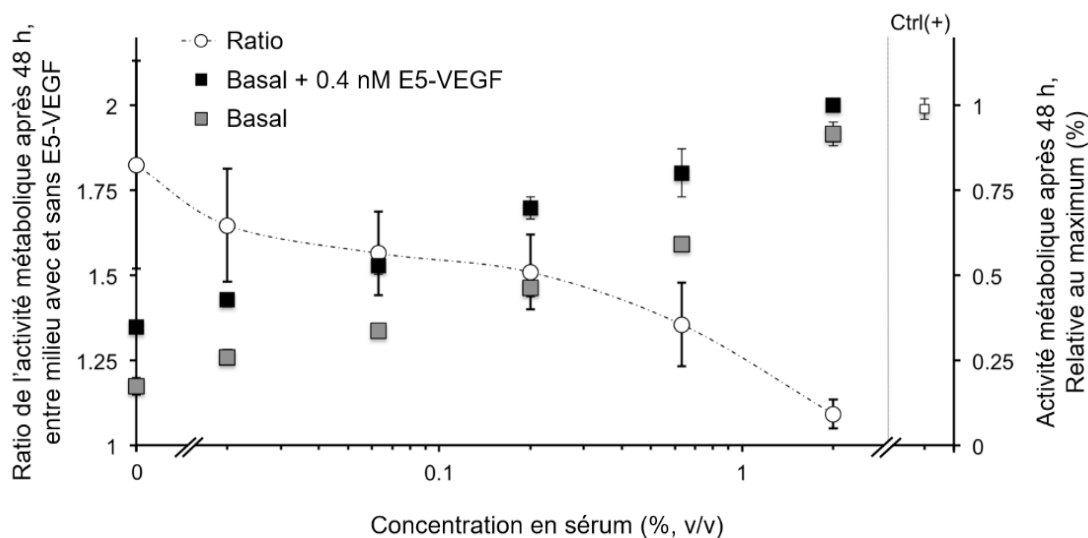


Figure 7-2 : Influence de la concentration de sérum sur la stimulation cellulaire par E5-VEGF.

Mesures d'activité métabolique d'HUVEC après 48 h de culture en présence ou en absence d'E5-VEGF, dans des concentrations variables de sérum.

nettement durant les tests préliminaires (voir **Figure 7-2**). La plupart des études subséquentes ont été, quant à elles, menées sur le potentiel mitogénique de la chimère en conditions prolifératives, qui mettent en jeu des voies de signalisation totalement différentes (voir **Figure 2-5**). L'on notera en outre que ces essais ont été menés dans des plaques à puits CellBIND®, au sein desquelles nous avons observé ultérieurement une forte adsorption de VEGF et d'E5-VEGF (voir **Figure 6-2.C**). Il est ainsi probable que le test de survie « en solution » ait mis en jeu une protéine partiellement immobilisée.

Portion E5

La disponibilité de la portion E5 de la chimère a, quant à elle, été démontrée par capture de la protéine sur des substrats modifiés avec le peptide K5, en utilisant VEGF natif comme contrôle. Les résultats présentés dans l'article publié, Chapitre 4, démontrent que l'étiquette E5 interagit spécifiquement avec son partenaire immobilisé sur la surface de dextrane carboxyméthylé d'un biocapteur SPR. Un substrat modèle de verre aminé aisément manipulable a ensuite été sélectionné

pour la suite de l'étude. Sur ce dernier, le contrôle avec E5-VEGF injecté sur une surface sans K5, bien que n'apparaissant pas dans l'article, a confirmé la nécessité des interactions superhélices pour la capture de la protéine (voir **Figure 7-3**). D'autres contrôles ont cependant mis en évidence la propension du peptide K5 à s'adsorber, ce qui suggère que son greffage n'était que partiellement covalent. De plus, le rendement de greffage sur ce substrat modèle est apparu très faible : 32 ± 16 fmol.cm⁻² obtenus, soit ca. 1,2% de la quantité injectée, contre 0,003% pour VEGF non étiqueté. Néanmoins, ces limitations quant à la spécificité et au rendement ont été fortement améliorées par la suite (voir section 7.3.1).

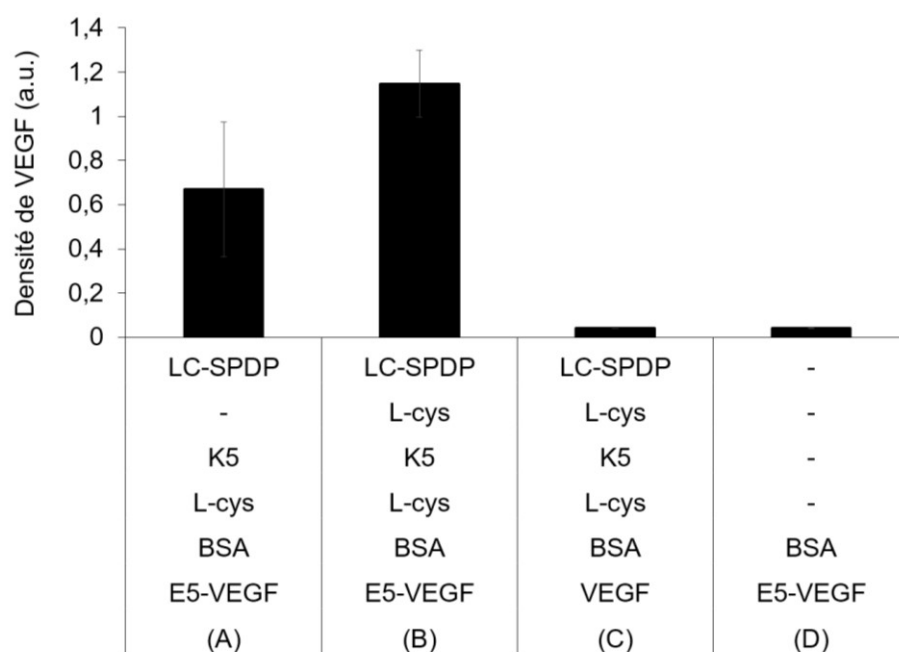


Figure 7-3 : Capture d'E5-VEGF sur du verre aminé mesurée par ELISA direct.

- (A) Stratégie de greffage classique, avec le peptide capturé par le bras espaceur (LC-SPDP).
 (B) Le contrôle avec le bras espaceur bloqué avant incubation indique l'adsorption du peptide K5 et/ou d'E5-VEGF. L'absence de signal pour (C) VEGF sur le peptide adsorbé ou pour (D) E5-VEGF en absence de K5 démontre la nécessité des interactions superhélices et l'absence d'adsorption directe d'E5-VEGF.

7.1.3 Sous-objectif *iii* : activité biologique d'E5-VEGF immobilisé

Tel qu'indiqué dans la section 4.7.9, la capacité de la chimère immobilisée par interactions superhélices à stimuler des cellules endothéliales a été démontrée. Plus précisément, le test réalisé a mis en évidence la capacité d'E5-VEGF immobilisé à stimuler la survie d'HUVEC. Des comparaisons quantitatives semblent de plus indiquer que l'activité d'E5-VEGF immobilisé est supérieure à celle de VEGF en solution. Au vu de la stabilité observée par biocapteur SPR, il est ici suggéré que la protéine n'a pas été libérée dans le milieu de culture durant les 48 h de l'essai. C'est dans un essai ultérieur que la vitesse de libération en absence de cellules a été confirmée comme étant très lente par test ELISA (20% en 7 jours, **Figure 5-6**). Enfin, la capacité de la protéine immobilisée à stimuler non seulement la survie mais aussi la prolifération d'HUVEC a été démontrée dans deux publications réalisées en marge de cette thèse (Lequoy, Murschel, Liberelle, Lerouge, & De Crescenzo, 2016; Noel et al., 2016).

7.2 Objectif 2 : modulation de la stabilité d'E5-VEGF

7.2.1 Sous-objectif *iv* : conception et production de variants du K5

La conception rationnelle de peptides analogues du peptide K5 a été réalisée en partenariat avec le Prof. Robert S. Hodges à l'Université du Colorado, Denver. Un échantillon limité à trois peptides obtenus par reconception a été choisi, sur la base de substitutions Leucine→Alanine à la position *d*, puis produit et purifié au sein du laboratoire de ce dernier. Tel que mentionné dans les sections 2.3.3 et 5.9.1, de nombreuses autres approches pourraient être employées afin d'étendre la banque de peptides, notamment le nombre d'heptades, la position et le type de substitutions, voire l'introduction d'acides aminés non naturels. En outre, l'extension N-terminale CGG a été conservée, afin de greffer les peptides par le groupement thiol porté par la cystéine. Cette stratégie présente cependant deux limitations importantes, discutées ci-dessous (section 7.3.1).

7.2.2 Sous-objectif *v* : activité des variants du K5

La capacité des variants à former des interactions superhélices a été déterminée de façon indirecte, par leur immobilisation puis le recrutement de leurs partenaires biologiques (E5, E5-EGF, E5-VEGF), au moyen d'un biocapteur SPR et d'essais ELISA. Bien que l'application

d'intérêt soit validée, une confirmation de la formation de superhélices pourrait être menée au moyen de mesures par dichroïsme circulaire qui permettraient, en outre, d'estimer le degré d'oligomérisation des complexes formés. Les essais à mener en ce sens, notamment le titrage (avec ou sans trifluoroéthanol, un agent inducteur d'hélice alpha) et le suivi de dénaturation (température, chlorure de guanidium) pourront être inspirés de travaux antérieurs (Litowski & Hodges, 2001, 2002; Zhou, N. E., Kay, & Hodges, 1994). Enfin, pour une étude approfondie de l'état d'oligomérisation, des essais par ultracentrifugation analytique, sur la base de la méthode par équilibre de sédimentation, ou par séparation en chromatographie d'exclusion par la taille pourront être réalisés.

7.2.3 Sous-objectif vi : atteinte de la gamme d'affinités visée

Le calcul des constantes cinétiques et thermodynamiques de l'interaction entre E5-VEGF et les 4 peptides analogues a été mené grâce à un biocapteur SPR, sur la base d'un modèle d'interaction à trois états, soit une étape de dimérisation suivie d'une étape de réarrangement conformationnel. Malgré une certaine adéquation entre les données et le modèle, la complexité de l'interaction a fortement limité la confiance apportée aux constantes cinétiques déterminées et, dans une moindre mesure, aux données thermodynamiques.

Les constantes de dissociation apparentes obtenues pour E5-VEGF s'étendent sur une plage 2×10^{-10} à 1×10^{-13} M, soit une couverture partielle de la gamme visée (2×10^{-7} à 2×10^{-11} M). Néanmoins, plusieurs solutions s'offrent à nous pour atteindre cet objectif. En premier lieu, tel que mentionné ci-avant, l'ample littérature sur les interactions superhélices permettrait aisément d'étendre aisément la banque de peptides analogues du peptide K5, en vue de diminuer la stabilité de l'interaction (diminution du nombre d'heptades, perturbation du cœur hydrophobe, ...). En second lieu, des essais complémentaires avec E5-EGF ont été menés par biocapteur SPR. Pour ce facteur de croissance qui ne présente qu'une étiquette E5, les affinités obtenues étaient bien plus basses, de 2×10^{-7} à 2×10^{-10} M. À l'image du système développé par Backer et collègues pour l'étiquetage de VEGF₁₂₁ avec une, et une seule, cystéine N-terminale (Backer et al., 2006), une protéine recombinante correspondant à E5-VEGF en « chaîne simple » pourrait être produite. Cette approche consiste en l'introduction de l'ADN codant pour E5 et de deux répétitions de la séquence codant pour VEGF₁₆₅ au sein du même plasmide. Par ce moyen, le repliement de la protéine par

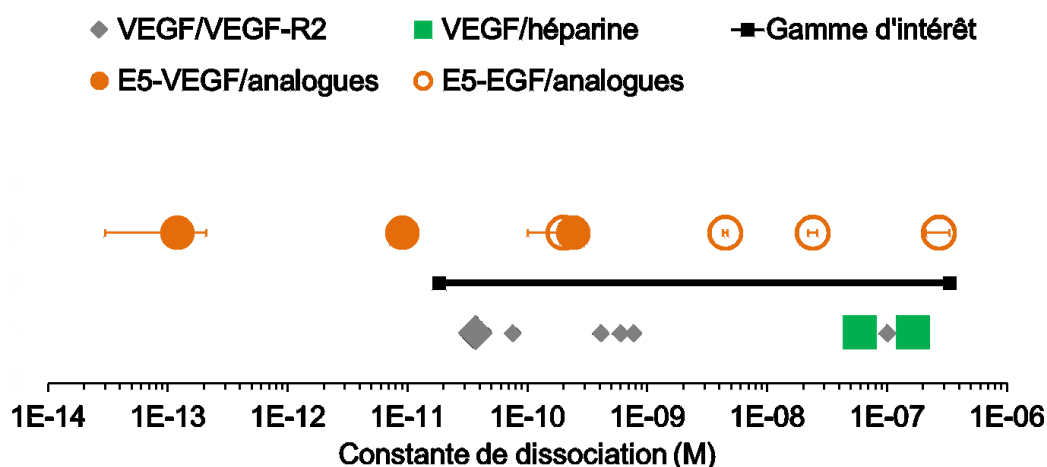


Figure 7-4 : Constantes de dissociation des interactions entre VEGF et ses partenaires biologiques, et résultats obtenus par biocapteur SPR.

Les données obtenues par biocapteur SPR sont indiquées par des marques de grande taille. Données obtenues à partir de (Ashikari-Hada et al., 2004; Cochran, Li, & Ferro, 2009; Cunningham, Tran, Arrate, & Brock, 1999; Krilleke et al., 2007; Millauer et al., 1993; Quinn, Peters, Devries, Ferrara, & Williams, 1993; Sawano, Takahashi, Yamaguchi, Aonuma, & Shibuya, 1996; Terman et al., 1992; Waltenberger, Claesson-Welsh, Siegbahn, Shibuya, & Heldin, 1994).

ponts disulfures intramoléculaires conduit à sa forme active, sans dimérisation intermoléculaire, et la protéine obtenue ne présenterait qu'une étiquette E5. Il serait attendu que cette nouvelle protéine, E5-VEGF chaîne simple, interagisse avec les 4 analogues avec des constantes de dissociation proches de celles obtenues pour E5-EGF, couvrant ainsi le reste de la gamme visée tel qu'indiqué sur la **Figure 7-4**.

Enfin, il convient de rappeler la discordance entre les résultats obtenus par biocapteur SPR et par test ELISA en plaques à puits (discussion de l'article 2, section 5.9.7), en particulier vis-à-vis de la libération d'E5-VEGF immobilisé. En effet, la dissociation des complexes E5-VEGF/analogue diffère grandement selon l'analogue employé pour immobiliser le facteur de croissance, lorsque mesuré sous flux continu en SPR. Aucune différence significative n'a cependant été observée par ELISA entre les analogues dans un contexte semi-statique (renouvellement quotidien du milieu). Ce type de disparité entre résultats obtenus par deux

techniques différentes se retrouve dans la littérature, par exemple pour les mesures de l'affinité du complexe VEGF/VEGF-R2 effectuées par biocapteur SPR ou par capture cellulaire *in vitro* (cf. **Figure 7-4**). Il conviendra donc d'y prêter une grande attention par la suite et, dans un objectif de pertinence physiologique, de mener des essais cellulaires sous flux continu.

7.3 Objectif 3 : contrôle de la réponse cellulaire en réponse à E5-VEGF immobilisé

7.3.1 Sous-objectifs *vii* et *viii* : conception et optimisation du substrat

La réussite de l'étude nécessite un contrôle fin de la capture d'E5-VEGF. Cependant, il a été observé au cours du projet – et rapporté dans le troisième article, Chapitre 6 – que le peptide K5 et la protéine E5-VEGF présentent une grande propension à la physisorption. L'adsorption directe du facteur de croissance est en particulier critique, car elle apporte un biais considérable quant à la stabilité de la protéine immobilisée : elle ne fait pas intervenir le peptide complémentaire et dépend fortement de la présence et la nature du milieu, notamment la présence de protéines en solution (**Figure 6-3**).

Nouveau revêtement à base de dextrane

La recherche d'un substrat neutre permettant l'immobilisation spécifique et contrôlée d'E5-VEGF a été conduite en collaboration avec plusieurs membres du laboratoire, et un substrat adéquat a pu être développé (Noel et al., 2016) et employé pour les essais ELISA de l'article 2 (voir **Figure 5-6**). Afin de limiter l'adsorption des peptides et protéines, le matériau d'intérêt (par exemple le polystyrène des plaques à puits) est recouvert de dextrane, un polymère présentant des propriétés répulsives, ou *low-fouling*, vis-à-vis des protéines et des cellules. La pré-modification de ce polymère avec du divinylsulfone permet le greffage covalent du peptide K5 via le groupement thiol de la cystéine N-terminale, ainsi que le greffage d'un peptide d'adhésion (CGGRGD) pour permettre l'adhésion cellulaire. À l'opposé des divers substrats précédemment employés, l'adsorption directe d'E5-VEGF est négligeable sur ce revêtement (voir condition « RGD », **Figure 7-5** ci-dessous). En outre, le rendement a été largement amélioré par rapport au verre aminé, ce qui a permis de stimuler la prolifération cellulaire à un niveau équivalent au contrôle positif pour

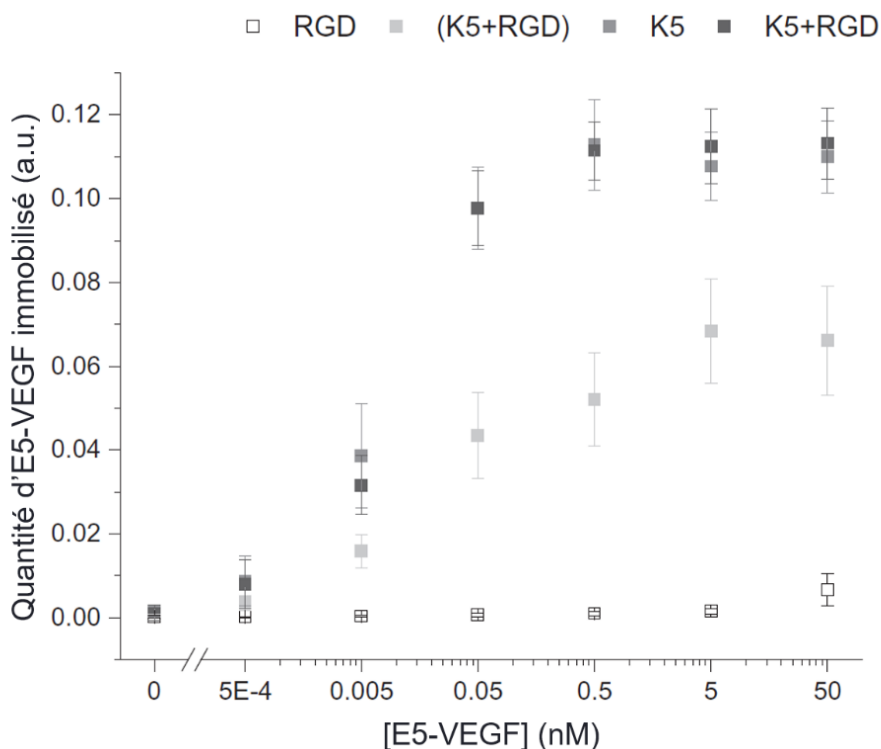


Figure 7-5 : Capture d'E5-VEGF sur des surfaces de dextrane fonctionnalisées.

Quantification par ELISA direct d'E5-VEGF capturé sur du dextrane fonctionnalisé avec le peptide d'adhésion RGD et/ou le peptide K5. La condition « (K5+RGD) » correspond à une surface bloquée avant l'incubation des deux peptides, ce qui représente donc leur adsorption non-spécifique. Figure adaptée avec permission de *Elsevier* (Noel et al., 2016).

seulement 500 pM d'E5-VEGF incubés (ca. 50 fmol.cm⁻² et 30% de rendement, contre 20 nM incubés pour obtenir 32 fmol.cm⁻² et 1,2% de rendement pour le verre aminé). L'amélioration du rendement a permis, en outre, une mesure quantitative de la quantité d'E5-VEGF immobilisé par ELISA indirect (mesure de la concentration dans le surnageant en fin d'incubation). Cette technique est plus fiable que l'ELISA direct avec calibration employé dans le premier article de cette thèse, et plus facile à mettre en œuvre que le marquage par fluorophore ou radiomarquage à l'iode 125.

Tel qu'indiqué dans la **Figure 7-5**, la capture d'E5-VEGF sur la surface contrôle « (K5+RGD) » renvoie un signal important en ELISA : cette stratégie ne limite que modestement

l'adsorption du peptide K5. Ce phénomène, moins crucial que l'adsorption directe d'E5-VEGF, demeure problématique dans la mesure où l'affinité d'E5-VEGF pour le peptide K5 est possiblement différente si ce dernier est greffé de manière covalente ou adsorbé. De plus, la stabilité d'E5-VEGF immobilisé pourrait, pour K5 adsorbé, être gouvernée par l'interaction peptide/surface et non plus l'interaction superhélice.

Limitations et pistes d'amélioration

De nombreuses expériences ont été menées afin de minimiser l'adsorption parasite du peptide K5, en variant les paramètres d'incubation : température, durée, solution tampon, pH, force ionique, concentration, etc. – sans succès notable. La stratégie de greffage via la fonction thiol de la cystéine N-terminale présente deux limitations majeures qui peuvent expliquer les difficultés rencontrées.

En premier lieu, le peptide K5 présente une forte inclination à s'oxyder (plus de 50% d'oxydation en 150 min à pH 7,4), ce qui limite grandement le rendement de greffage (Noel, 2015). Afin d'obtenir une densité de K5 suffisante pour la capture subséquente d'E5-VEGF, il est ainsi nécessaire d'employer des concentrations importantes du peptide (1 μM , soit 20 000 fois plus que

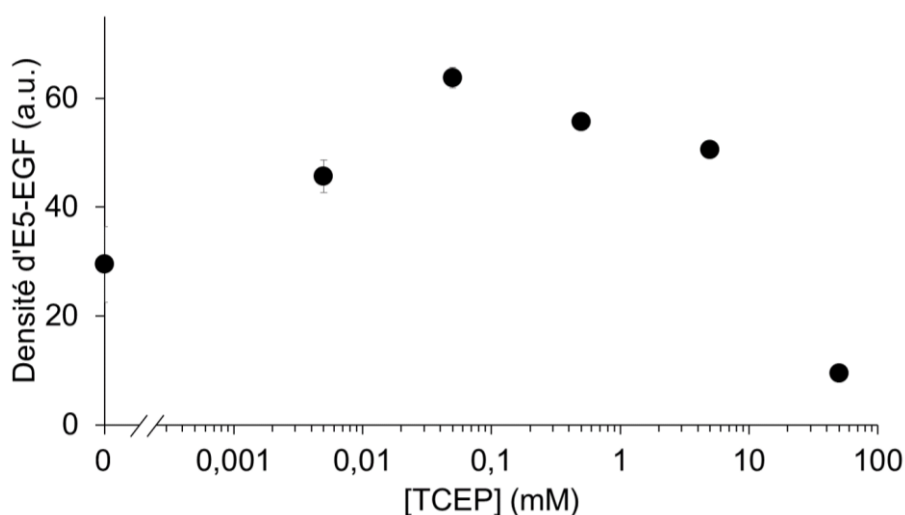


Figure 7-6 : Influence de la concentration de TCEP sur le greffage du peptide K5.

Quantification par ELISA direct d'E5-EGF capturé sur du dextran-vinylsulfone, après incubation du peptide K5 dans différentes concentrations de TCEP.

la protéine), ce qui favorise une adsorption massive en plus d'être couteux. L'emploi d'agents réducteurs ne portant pas de fonction thiol, tel le tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), a été envisagé pour contrer l'oxydation rapide du peptide sans entrer en compétition avec son greffage. Les résultats obtenus pour la capture d'E5-EGF, présentés sur la **Figure 7-6**, démontrent le fort potentiel de cette approche, avec un signal ELISA doublé lorsque le peptide est incubé en présence de 50 μ M de TCEP. Cependant l'agent réducteur a une influence négative à de fortes concentrations, ce qui suggère une réaction parasite de ce dernier avec le groupement vinylsulfone.

En second lieu, l'emploi d'un groupement générique tel que le thiol prohibe l'emploi d'agents bloquants pendant le greffage du peptide, c.-à-d. de protéines compétitrices pour les sites d'adsorption, telles que la très commune albumine de sérum bovin (BSA) qui présente un groupement thiol libre (Kamiya, 1997). Inspiré par les observations sur la libération de protéines adsorbées (**Figure 6-5**, article 3), l'emploi de protéines de compétition a posteriori a été testé et optimisé pour « désorber » le peptide K5 qui n'est pas greffé de manière covalente. Des essais menés en plaques ont en effet démontré l'intérêt d'incuber une solution fortement concentrée en protéines (10% v/v de sérum) pour limiter la quantité de peptides adsorbés (voir **Figure 7-7** pour K5 détecté indirectement via E5-EGF). L'addition de cette étape ne diminue cependant pas suffisamment la quantité de peptide adsorbé lorsqu'E5-VEGF est incubé, comme observé sur la **Figure 7-5**. Ceci est fort probablement lié à une sensibilité supérieure du facteur de croissance dimère à détecter des faibles densités surfaciques de K5, en comparaison au monomère E5-EGF.

Pour le plein contrôle du greffage d'E5-VEGF par interactions superhélices, un changement de stratégie pour le greffage du peptide K5 et l'élimination du groupement thiol paraissent inévitables. Pour ce faire, il est possible de s'inspirer des réactions bio-orthogonales, voire des réactions « clic », en pleine expansion dans le domaine biochimique. Le peptide K5 étant synthétisé par voie chimique, et non biologique, l'introduction d'un groupement réactif spécifique sur ce dernier est aisée et ne nécessite que la substitution de la cystéine N-terminale par un acide aminé non naturel bien choisi. On pourra notamment s'intéresser à l'azidohomoalanine (Aha) qui présente, sur sa chaîne latérale, un groupement azoture capable de réagir avec un alcynes. Cette ligature chimiosélective (cycloaddition de Huisgen) est usuellement catalysée par le cuivre, bien que certains alcynes (cyclooctines) permettent d'obtenir des rendements de réaction élevés à température ambiante et en absence de cuivre (Chang et al., 2010). De plus, le produit de réaction, un triazole, est hautement stable et résistant à l'hydrolyse, à l'oxydation et à la réduction (Kolb &

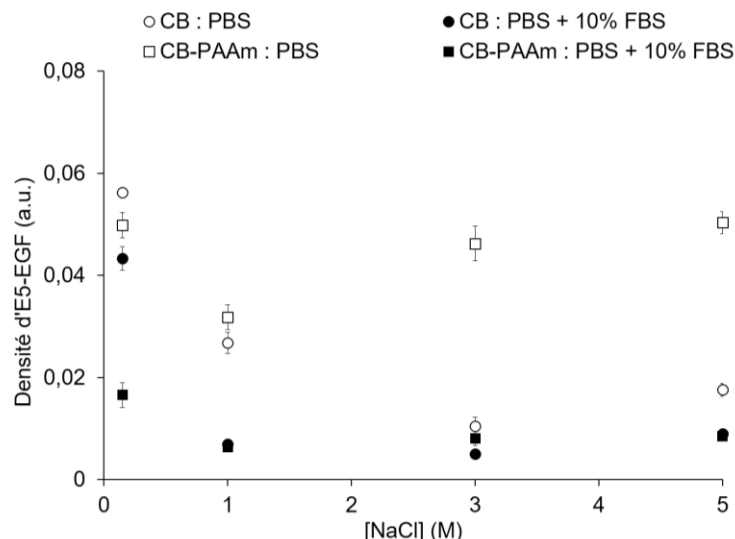


Figure 7-7 : Influence de l'incubation de sérum a posteriori sur l'adsorption de K5.

Quantification par ELISA direct d'E5-EGF capturé sur des plaques multi-puits (CellBIND®, CB, fonctionnalisées ou non avec du polyallylamine, PAAm). Les surfaces ont été pré-incubées avec le peptide K5 dilué dans du tampon phosphate (PBS) à diverses forces ioniques ([NaCl]). Après l'adsorption du K5 et avant l'injection d'E5-EGF, les puits ont été couverts durant 24 h avec du PBS supplémenté ou non de 10% v/v de sérum fœtal bovin (FBS).

Sharpless, 2003). L'emploi du peptide reconçu (Aha)GG-(KVSALKE)₅ devrait ainsi permettre d'améliorer le rendement, par l'élimination du phénomène de dimérisation, et de diminuer les concentrations à incuber. Son adsorption serait donc limitée, d'autant plus que cette réaction est compatible avec l'emploi d'agents protéiques de compétition (BSA ou sérum), puisque le groupement alcyne n'est pas présent naturellement dans les protéines. Cette particularité a d'ailleurs rendu possible l'application de la cycloaddition de Huisgen in vivo dans des souris (Chang et al., 2010).

7.3.2 Sous-objectif ix : étude du comportement cellulaire

Les travaux menés durant cette thèse, tout comme les suggestions d'amélioration présentées ci-avant, sont concentrés sur l'hypothèse technologique énoncée au Chapitre 3. La complétion du projet de recherche, par la validation de l'hypothèse biologique, nécessitera une étude approfondie

de la réponse cellulaire à VEGF immobilisé. Cette partie présente les directives, ou tout du moins des suggestions d'expériences, pour permettre son atteinte.

Plateforme de travail

Dans la continuité des essais menés, les cellules HUVEC pourront être employées, tout du moins en premier lieu, comme modèle de cellule endothéliale. Quant au substrat, les plaques à multi-puits de type CellBIND recouvertes de dextrane-vinylsulfone pourront être employées pour le greffage des peptides K (co-immobilisé avec le peptide RGD pour permettre l'adhésion cellulaire). Quant à E5-VEGF, capturé par interactions superhélices, il conviendrait de tester plusieurs densités lors de chaque essai (e.g. une gamme couvrant 1 à 100 fmol.cm⁻², (Anderson, Siegman, & Segura, 2011)); une optimisation préalable s'avérera nécessaire pour déterminer les concentrations à incuber sur chacun des 4 analogues du peptide K (cf. **Figure annexe -7**). Pour tout essai, des contrôles avec VEGF en solution devront être employés, également à plusieurs concentrations, tandis que des surfaces à base de PAAm sur lequel E5-VEGF serait adsorbé de façon orientée pourraient servir de point supplémentaire de comparaison (voir Chapitre 6).

Suivi cellulaire : échelle microscopique

Des essais pourront être menés avec diverses concentrations de sérum en solution, ainsi qu'en présence ou non d'autres facteurs de croissance, pour générer un environnement pro-prolifératif ou pro-apoptotique, comme indiqué sur la **Figure 7-7**. Le suivi des cellules incubées sur les divers substrats pourront être menés au moyen de comptage direct et/ou de suivi par essais d'activité métabolique mitochondriale (voir **Figure 4-5**) afin d'évaluer les niveaux de prolifération ou de survie, tout en suivant par microscopie leur phénotype apparent. Des essais migratoires pourront également être menés en suivant leur vitesse de déplacement, en présence ou non de gradients.

Suivi cellulaire : échelle moléculaire

Lors de ces divers essais, les comportements cellulaires à l'échelle micro- voire macroscopique pourront être corroborés par l'activation des voies de signalisation associées à la phosphorylation de VEGF-R1 et VEGF-R2, indiqués sur la **Figure 2-5**. Par exemple, des immunobuvardages de type Western permettraient de mesurer les cinétiques et niveaux de

phosphorylation des voies MAP kinase et FAK pour la migration, ERK pour la prolifération et PI3K/Akt pour la survie et/ou la perméabilité vasculaire. Les niveaux de phosphorylation de la eNO synthase et la production de NO pourraient enfin être mesurés pour discriminer survie et perméabilité vasculaire. La production de marqueurs pro-angiogéniques, tels que ANG2 et MMP2 pourraient également être suivis par RT-PCR en temps réel (Assal et al., 2013).

Suivi des interactions VEGF/VEGF-R : endocytose de VEGF

L'étude du comportement cellulaire serait menée en parallèle d'une caractérisation fine de la stabilité de la protéine immobilisée. La quantification par ELISA direct menée pour les articles 2 et 3 pourrait ainsi être complétée par des mesures indirectes, afin de déterminer avec justesse la quantité d'E5-VEGF libéré par la seule thermodynamique de l'interaction avec les peptides analogues, et donc sa présence sous forme diffusible. La libération totale après le contact avec les cellules (libération par compétition, dégradation enzymatique et endocytose) pourrait quant à elle être quantifiée en mesurant directement sur la surface la quantité d'E5-VEGF restante, après le décollement des cellules au moyen d'un détergent léger, le mélange enzymatique doux Accutase™ ou de faibles concentrations de trypsine/EDTA. Cette stratégie a notamment été employée avec succès pour le détachement de cellules CHO adhérentes sur une couche d'insuline, sans dégradation de cette dernière (Ito, Zheng, Imanishi, Yonezawa, & Kasuga, 1996). Sa validité pour notre revêtement pourrait être appuyée par des essais SPR et SDS-PAGE, afin d'évaluer la libération et la dégradation d'E5-VEGF que les agents proposés pourraient induire. Afin de compléter ces essais par ELISA, des essais par biotinylation pourraient être mis en place. Brièvement, E5-VEGF serait étiqueté avec une biotine clivable (e.g. une biotine liée à un groupement NHS par un pont disulfure) avant son immobilisation sur la surface et l'injection des cellules. Au point temporel choisi, les cellules seraient incubées avec de la glutathionne ou de TCEP afin de libérer la biotine liée à E5-VEGF extracellulaire, détachées avec douceur et lysées. Un test ELISA « en sandwich » sur le lysat permettrait enfin de mesurer les quantités d'E5-VEGF internalisées (voir **Figure 7-8**).

Suivi des interactions VEGF/VEGF-R : endocytose de VEGF-R et trafic intracellulaire

De la même manière, les cinétiques d'internalisation des récepteurs à VEGF, en particulier VEGF-R2, pourraient être mesurées au moyen d'essais par biotinylation. Ceci pourrait être réalisé en liant cette fois la biotine clivable aux récepteurs par incubation directe des cellules avec la

biotine-NHS, puis en employant un anticorps anti-VEGF-R2 dans l'ELISA « en sandwich ». En utilisant des contrôles appropriés et de multiples cycles de clivage de la biotine, le recyclage et la dégradation de VEGF-R2 peuvent alors être estimés (Chen, T. T. et al., 2010; Lampugnani et al., 2006). Qui plus est, le trafic intracellulaire pourrait être suivi par immunofluorescence, en employant des anticorps primaires ciblant VEGF, ses récepteurs et les marqueurs d'endosomes spécifiques (Rab, voir section 2.1.3.4) en combinaison avec des anticorps secondaires conjugués à des fluorophores différents. Une telle approche permettrait d'évaluer si VEGF et/ou ses récepteurs sont dirigés vers les voies de recyclage ou de dégradation. Enfin, la technologie FRET (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes) pourrait être mise à profit pour suivre avec finesse l'interaction entre VEGF et son récepteur et l'éventuelle dissociation du complexe. L'ensemble des essais suggérés nécessiterait de nombreux contrôles, notamment en incubant le récepteur sous forme soluble ou des inhibiteurs de l'internalisation.

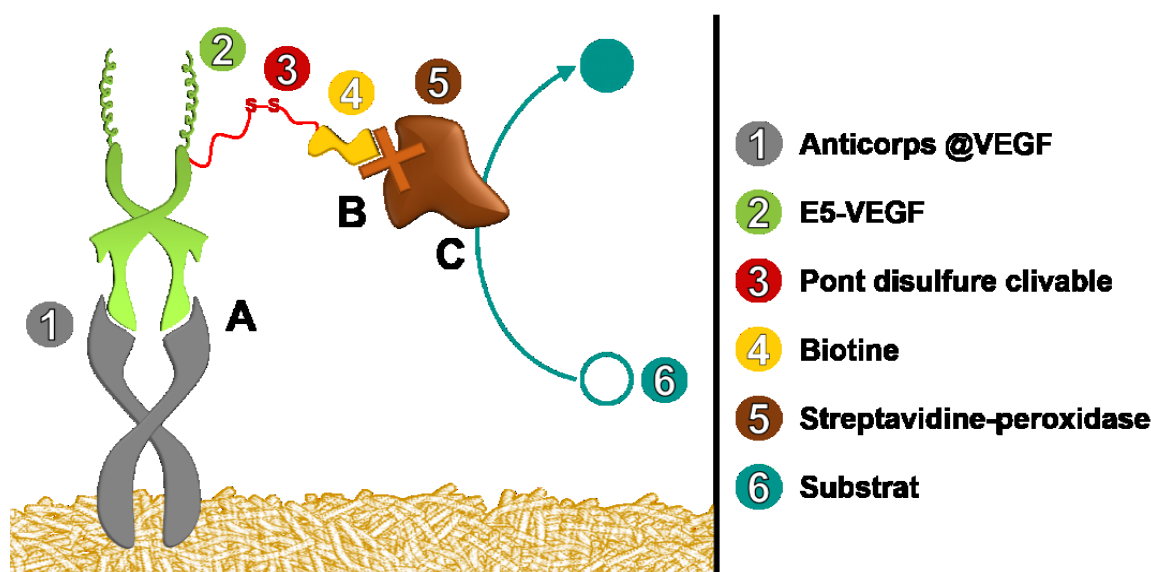


Figure 7-8 : Test ELISA « en sandwich » pour quantification d'E5-VEGF internalisé.

(A) Le lysat cellulaire contenant E5-VEGF biotinylé est incubé sur une surface préalablement décorée avec un anticorps anti-VEGF. (B) La biotine portée par E5-VEGF est détectée par une protéine de fusion : la streptavidine-peroxydase. (C) L'incubation d'un substrat sensible à l'enzyme permet la quantification, par mesure de l'absorbance.

Note

Les divers essais proposés ci-avant, notamment les tests ELISA voire les suivis par immunofluorescence, pourraient être menés, au besoin ou en complément, avec E5-VEGF marqué à l'iode I^{125} et donc par suivi de désintégration radioactive. Une troisième approche serait celle d'un marquage fluorescent. Une conjugaison post-production semble préférable, et plus simple à mettre en œuvre, que la construction d'une nouvelle protéine de fusion. Plus précisément, une conjugaison au niveau du glycan porté par VEGF est conseillée afin de ne pas encombrer les sites actifs : domaines de liaison aux récepteurs et étiquette E5. Pour ce faire, les polysaccharides peuvent être activés par de l'acide periodique afin de générer un groupement aldéhyde (Sharon & Puleo, 2008), lequel peut être employé pour un greffage spécifique d'un fluorophore porteur d'un groupement hydrazide.

Boîte 7-1 : Discussion générale : message à retenir

- **Résultats obtenus :** La protéine chimère E5-VEGF a été produite et caractérisée avec succès : interaction avec VEGF-R1 et VEGF-R2, stimulation de la survie et de la prolifération cellulaires – en solution et immobilisée via le peptide K5. Trois analogues du peptide K5 ont été conçus et permettent de moduler l'affinité d'E5-VEGF pour le substrat (K_D entre 10^{-10} et 10^{-13} M). Un protocole de greffage a été développé sur un revêtement de dextrane, avec une nouvelle étape de désorption a posteriori : baisse de l'adsorption de K5, suppression de l'adsorption d'E5-VEGF et rendement proche de 30%.
- **Approfondissements suggérés :** La plateforme de production et de purification d'E5-VEGF pourrait être révisée afin d'augmenter les rendements, par exemple via un clone stable. Les peptides analogues pourraient être caractérisés par dichroïsme circulaire pour évaluer le degré d'oligomérisation des complexes. La gamme d'affinité pourrait être étendue pour atteindre l'objectif (2×10^{-7} à 2×10^{-11} M), au moyen d'une chimère « chaîne simple » ou de nouveaux analogues du peptide K5. La stratégie de greffage du peptide K5 pourrait être révisée au profit d'une chimie bio-orthogonale, afin d'améliorer le rendement et de diminuer l'adsorption parasite.
- **Aboutissement du projet :** La validation de l'hypothèse biologique du projet nécessitera de comparer le comportement cellulaire en réponse à VEGF immobilisé avec plusieurs degrés de stabilité, ainsi qu'à plusieurs densités. En particulier, des essais de comptage et par microscopie pourront être menés pour suivre la prolifération, la migration et la survie cellulaire. Des essais par immunofluorescence, immunobuvardage, FRET et/ou ELISA sont proposés pour déterminer les cinétiques d'endocytose de VEGF et de ses récepteurs, leur trafic intracellulaire ainsi que les voies de signalisation activées.

CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

La présente thèse vise à surmonter le défi actuel majeur dans le domaine du génie tissulaire, en particulier les entraves de l'angiogenèse thérapeutique présentées durant la revue de littérature, Chapitre 2. Plus précisément, cette thèse s'articule autour de deux hypothèses qui ont été formulées dans le Chapitre 3 : la première, d'ordre biologique, énonce que l'imitation du contrôle spatiotemporel naturel de VEGF par une stratégie de greffage à stabilité contrôlée est requise pour répondre aux défis rencontrés dans le domaine de l'angiogenèse thérapeutique. La seconde, d'ordre technologique, porte sur l'adéquation du système superhélice, en termes de polyvalence et de modulation, pour contrôler la présentation et la stabilité de VEGF immobilisé.

Afin de valider ces hypothèses de recherche, le projet compte trois objectifs principaux. Les travaux réalisés ont permis l'atteinte de deux d'entre eux, soit la démonstration que le système superhélice permet d'immobiliser VEGF₁₆₅ sous une forme biologiquement active, et qu'il est largement modulable, en termes d'affinité et de stabilité. La complétion du projet est basée sur l'examen, en vue de son futur contrôle, de la réponse de cellules endothéliales en présence de VEGF immobilisé par interaction superhélice. Ce dernier objectif a été partiellement atteint au moyen de projets conjoints au sein du groupe de recherche. Les recommandations spécifiques pour l'aboutissement du projet sont discutées de manière détaillée dans le Chapitre 7 et résumées dans la **Boîte 7-1**.

Les accomplissements réalisés durant cette thèse apportent plusieurs opportunités de travaux et d'applications futures. En effet, les travaux présentés s'inscrivent dans une stratégie de groupe pour développer des biomatériaux fonctionnalisés permettant le traitement de pathologies variées. À cette fin ont été synthétisées, en marge du projet, les protéines chimères E5-EGF, K5-EGF (Boucher et al., 2008) et E5-bFGF (Addi, Murschel, Liberelle, Riahi, & De Crescenzo, 2017). L'emploi de ces protéines de fusion présente un grand intérêt pour le traitement endovasculaire de l'anévrisme de l'aorte abdominale (Lequoy, Liberelle, De Crescenzo, & Lerouge, 2014) et celui de maladies oculaires au moyen de greffons cornéens (Boucher, Ruiz, et al., 2010).

L'addition de VEGF étiqueté E5 au catalogue permet d'explorer de nouvelles applications dans le domaine de l'angiogenèse thérapeutique où l'immobilisation stable de VEGF est désirable, telles que présentées dans la sous-section 2.2.1, avec un accent sur les endoprothèses vasculaires, la génération de tissus *in vitro* et le développement de prothèses artérielles synthétiques de faible diamètre performantes (Noel et al., 2016).

La multiplicité des facteurs de croissance étiquetés E5, en combinaison avec les – désormais – 4 peptides K partenaires, devrait permettre à moyen terme la construction de systèmes de libération contrôlée complexes capables de mimer l'arrangement spatiotemporel observé dans les processus physiologiques. Une première étude menée en ce sens, sur la co-immobilisation d'E5-EGF et d'E5-VEGF, a porté ses fruits (Lequoy et al., 2016), et une seconde avec E5-bFGF et E5-VEGF serait d'un intérêt majeur pour l'angiogenèse thérapeutique.

La stratégie de capture par adsorption contrôlée, apparue et caractérisée en marge de l'objectif principal de cette thèse, ouvre quant à elle la voie à (i) des protocoles de fonctionnalisation de surface rapides et hautement simplifiés, et à (ii) de nouvelles méthodes d'encapsulation pour une délivrance sans fuite initiale (cf. **Figure 6-5**).

La multiplicité des outils à notre disposition, et l'expérience acquise durant leur mise en place, pourraient être mises à profit pour le développement de systèmes multifonctionnels hautement adaptables selon les besoins du tissu à soulager, à guérir ou à remplacer, tels que des hydrogels injectables chargés en protéines (e.g. facteurs de croissance), en nanoparticules (e.g. polyplexes pour la thérapie génique) ou en liposomes (e.g. chargés en drogues pour la chimiothérapie) – comme proposé sur la **Figure 8-1**.

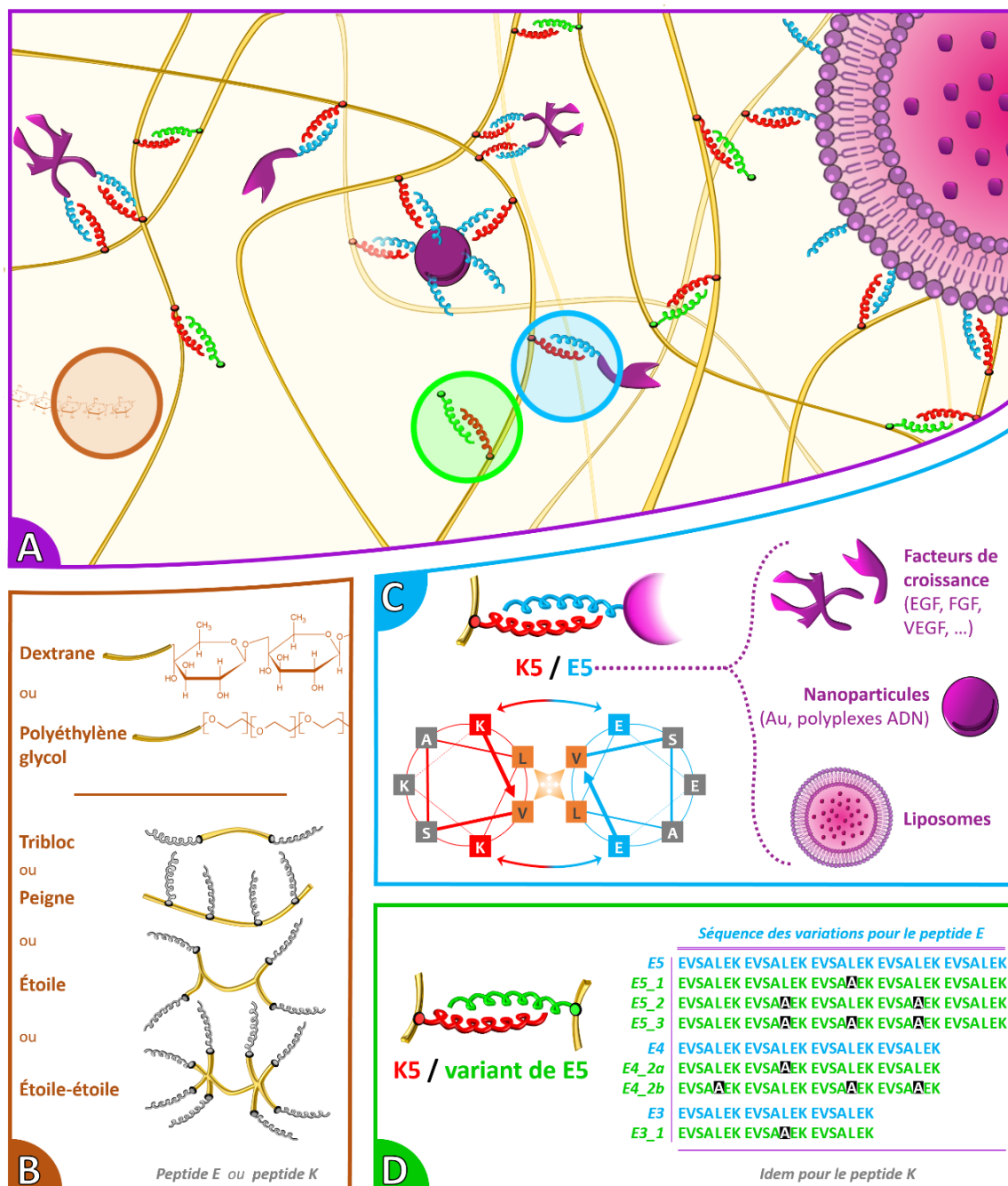


Figure 8-1 : Représentation schématique d'un hydrogel à base d'interactions superhélices.

(A) Vue d'ensemble d'un hydrogel biofonctionnel formé par la réticulation de (B) deux polymères porteurs de peptides complémentaires et chargé de (C) diverses biomolécules. Le contrôle de la dégradation du gel et de la libération des molécules est assurée par (D) des interactions superhélices entre le peptide K5 et des variants du peptide E5, ou inversement.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, S., Yeo, M., Montero-Balaguer, M., Paterson, H., Dejana, E., Marshall, C. J., & Mavria, G. (2009). VE-Cadherin-mediated cell-cell interaction suppresses sprouting via signaling to MLC2 phosphorylation. *Current Biology*, 19(8), 668-674. doi: 10.1016/j.cub.2009.02.057
- Adams, R. H., & Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(6), 464-478. doi: 10.1038/nrm2183
- Addi, C., Murschel, F., Liberelle, B., Riahi, N., & De Crescenzo, G. (2017). A highly versatile adaptor protein for the tethering of growth factors to gelatin-based biomaterials. *Acta Biomaterialia*, 50 198-206. doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.014
- Aizawa, Y., Wylie, R., & Shoichet, M. (2010). Endothelial cell guidance in 3D patterned scaffolds. *Advanced Materials*, 22(43), 4831-4835. doi: 10.1002/adma.201001855
- Albuquerque, R. J. C., Hayashi, T., Cho, W. G., Kleinman, M. E., Dridi, S., Takeda, A., . . . Ambati, J. (2009). Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Natural Medicines*, 15(9), 1023-1030. doi: 10.1038/nm.2018
- Alwan, H. A., van Zoelen, E. J., & van Leeuwen, J. E. (2003). Ligand-induced lysosomal epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35781-35790. doi: 10.1074/jbc.M301326200
- Ambati, B. K., Nozaki, M., Singh, N., Takeda, A., Jani, P. D., Suthar, T., . . . Ambati, J. (2006). Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature*, 443(7114), 993-997. doi: 10.1038/nature05249
- Anderie, I., Schulz, I., & Schmid, A. (2007). Direct interaction between ER membrane-bound PTP1B and its plasma membrane-anchored targets. *Cellular Signalling*, 19(3), 582-592. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.08.007
- Anderson, S. M., Chen, T. T., Iruela-Arispe, M. L., & Segura, T. (2009). The phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) by engineered surfaces with

- electrostatically or covalently immobilized VEGF. *Biomaterials*, 30(27), 4618-4628. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.030
- Anderson, S. M., Shergill, B., Barry, Z. T., Manousiouthakis, E., Chen, T. T., Botvinick, E., . . . Segura, T. (2011). VEGF internalization is not required for VEGFR-2 phosphorylation in bioengineered surfaces with covalently linked VEGF. *Integrative Biology*, 3(9), 887-896. doi: 10.1039/c1ib00037c
- Anderson, S. M., Siegman, S. N., & Segura, T. (2011). The effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) presentation within fibrin matrices on endothelial cell branching. *Biomaterials*, 32(30), 7432-7443. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.027
- Apte, J. S., Collier, G., Latour, R. A., Gamble, L. J., & Castner, D. G. (2010). XPS and ToF-SIMS investigation of alpha-helical and beta-strand peptide adsorption onto SAMs. *Langmuir*, 26(5), 3423-3432. doi: 10.1021/la902888y
- Armstrong, C. T., Boyle, A. L., Bromley, E. H. C., Mahmoud, Z. N., Smith, L., Thomson, A. R., & Woolfson, D. N. (2009). *Faraday Discussions*, 143 305.
- Aronsson, C., Danmark, S., Zhou, F., Oberg, P., Enander, K., Su, H., & Aili, D. (2015). Self-sorting heterodimeric coiled coil peptides with defined and tuneable self-assembly properties. *Sci Rep*, 5 14063. doi: 10.1038/srep14063
- Ashikari-Hada, S., Habuchi, H., Kariya, Y., Itoh, N., Reddi, A. H., & Kimata, K. (2004). Characterization of growth factor-binding structures in heparin/heparan sulfate using an octasaccharide library. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12346-12354. doi: 10.1074/jbc.M313523200
- Ashikari-Hada, S., Habuchi, H., Kariya, Y., & Kimata, K. (2005). Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31508-31515. doi: 10.1074/jbc.M414581200
- Assal, Y., Mie, M., & Kobatake, E. (2013). The promotion of angiogenesis by growth factors integrated with ECM proteins through coiled-coil structures. *Biomaterials*, 34(13), 3315-3323. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.067

- Assal, Y., Mizuguchi, Y., Mie, M., & Kobatake, E. (2015). Growth Factor Tethering to Protein Nanoparticles via Coiled-Coil Formation for Targeted Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 26(8), 1672-1677. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00266
- Augustin, H. G., Koh, G. Y., Thurston, G., & Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(3), 165-177. doi: 10.1038/nrm2639
- Backer, M. V., Patel, V., Jehning, B. T., Claffey, K. P., & Backer, J. M. (2006). Surface immobilization of active vascular endothelial growth factor via a cysteine-containing tag. *Biomaterials*, 27(31), 5452-5458. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.025
- Baiguera, S., & Ribatti, D. (2013). Endothelialization approaches for viable engineered tissues. *Angiogenesis*, 16(1), 1-14. doi: 10.1007/s10456-012-9307-8
- Ballmer-Hofer, K., Andersson, A. E., Ratcliffe, L. E., & Berger, P. (2011). Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood*, 118(3), 816-826. doi: 10.1182/blood-2011-01-328773
- Banfi, A., von Degenfeld, G., Gianni-Barrera, R., Reginato, S., Merchant, M. J., McDonald, D. M., & Blau, H. M. (2012). Therapeutic angiogenesis due to balanced single-vector delivery of VEGF and PDGF-BB. *FASEB Journal*, 26(6), 2486-2497. doi: 10.1096/fj.11-197400
- Baron, R., Dashwood, M. R., Arbeus, M., Filbey, D., & Souza, D. S. R. (2010). Recent Strategies to Improve Graft Performance in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery. Are Best Results Achieved by Improved Surgical Techniques of Graft Preparation? Dans D. Abraham, H. Clive, M. Dashwood & G. Coghlan (Édit.), *Advances in Vascular Medicine* (p. 371-397). London: Springer London.
- Beamson, G., & Briggs, D. (1993). *High Resolution XPS of Organic Polymers: The Scienta ESCA300 Database* (vol. 70): American Chemical Society.
- Belair, D. G., Khalil, A. S., Miller, M. J., & Murphy, W. L. (2014). Serum-dependence of affinity-mediated VEGF release from biomimetic microspheres. *Biomacromolecules*, 15(6), 2038-2048. doi: 10.1021/bm500177c

- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., . . . Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology*, 2(10), 737-744. doi: 10.1038/35036374
- Blau, H. M., & Banfi, A. (2001). The well-tempered vessel. *Natural Medicines*, 7(5), 532-534. doi: 10.1038/87850
- Bordenave, L., Remy-Zolghadri, M., Fernandez, P., Bareille, R., & Midy, D. (1999). Clinical performance of vascular grafts lined with endothelial cells. *Endothelium*, 6(4), 267-275. doi: 10.3109/10623329909078494
- Boucher, C., Liberelle, B., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2009). Epidermal growth factor tethered through coiled-coil interactions induces cell surface receptor phosphorylation. *Bioconjugate Chemistry*, 20(8), 1569-1577. doi: 10.1021/bc9001147
- Boucher, C., Ruiz, J. C., Thibault, M., Buschmann, M. D., Wertheimer, M. R., Jolicoeur, M., . . . De Crescenzo, G. (2010). Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions. *Biomaterials*, 31(27), 7021-7031. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.072
- Boucher, C., St-Laurent, G., Jolicoeur, M., Crescenzo, G. D., & Durocher, Y. (2010). Protein detection by Western blot via coiled-coil interactions. *Analytical Biochemistry*, 399(1), 138-140. doi: 10.1016/j.ab.2009.12.007
- Boucher, C., St-Laurent, G., Loignon, M., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2008). The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags. *Tissue Engineering. Part A*, 14(12), 2069-2077. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0037
- Boyle, A. L., Bromley, E. H., Bartlett, G. J., Sessions, R. B., Sharp, T. H., Williams, C. L., . . . Woolfson, D. N. (2012). Squaring the circle in peptide assembly: from fibers to discrete nanostructures by de novo design. *Journal of the American Chemical Society*, 134(37), 15457-15467. doi: 10.1021/ja3053943
- Briquez, P. S., Clegg, L. E., Martino, M. M., Mac Gabhann, F., & Hubbell, J. A. (2016). Design principles for therapeutic angiogenic materials. *Nature Reviews Materials*, 1(1), 15006. doi: 10.1038/natrevmats.2015.6

- Bromley, E. H., Channon, K., Moutevelis, E., & Woolfson, D. N. (2008). Peptide and protein building blocks for synthetic biology: from programming biomolecules to self-organized biomolecular systems. *ACS Chemical Biology*, 3(1), 38-50. doi: 10.1021/cb700249v
- Bruns, A. F., Herbert, S. P., Odell, A. F., Jopling, H. M., Hooper, N. M., Zachary, I. C., . . . Ponnambalam, S. (2010). Ligand-stimulated VEGFR2 signaling is regulated by coordinated trafficking and proteolysis. *Traffic*, 11(1), 161-174. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.01001.x
- Burkhard, P., Meier, M., & Lustig, A. (2000). Design of a minimal protein oligomerization domain by a structural approach. *Protein Science*, 9(12), 2294-2301. doi: 10.1110/ps.9.12.2294
- Cao, L., & Mooney, D. J. (2007). Spatiotemporal control over growth factor signaling for therapeutic neovascularization. *Adv Drug Deliv Rev*, 59(13), 1340-1350. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.012
- Care, A., Bergquist, P. L., & Sunna, A. (2015). Solid-binding peptides: smart tools for nanobiotechnology. *Trends in Biotechnology*, 33(5), 259-268. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.02.005
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298-307. doi: 10.1038/nature10144
- Cass, B., Pham, P. L., Kamen, A., & Durocher, Y. (2005). Purification of recombinant proteins from mammalian cell culture using a generic double-affinity chromatography scheme. *Protein Expression and Purification*, 40(1), 77-85. doi: 10.1016/j.pep.2004.10.023
- Cassell, O. C., Hofer, S. O., Morrison, W. A., & Knight, K. R. (2002). Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *British Journal of Plastic Surgery*, 55(8), 603-610. doi: 10.1054/bjps.2002.3950
- Celiz, A. D., Smith, J. G., Langer, R., Anderson, D. G., Winkler, D. A., Barrett, D. A., . . . Alexander, M. R. (2014). Materials for stem cell factories of the future. *Nature Materials*, 13(6), 570-579. doi: 10.1038/nmat3972
- Chabot, C., Spring, K., Gratton, J. P., Elchebly, M., & Royal, I. (2009). New role for the protein tyrosine phosphatase DEP-1 in Akt activation and endothelial cell survival. *Molecular and Cellular Biology*, 29(1), 241-253. doi: 10.1128/MCB.01374-08

- Chang, P. V., Prescher, J. A., Sletten, E. M., Baskin, J. M., Miller, I. A., Agard, N. J., . . . Bertozzi, C. R. (2010). Copper-free click chemistry in living animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), 1821-1826. doi: 10.1073/pnas.0911116107
- Chao, H., Bautista, D. L., Litowski, J., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1998). Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 715(1), 307-329. doi: 10.1016/S0378-4347(98)00172-8
- Chao, H., Houston, M. E., Jr., Grothe, S., Kay, C. M., O'Connor-McCourt, M., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1996). Kinetic study on the formation of a de novo designed heterodimeric coiled-coil: use of surface plasmon resonance to monitor the association and dissociation of polypeptide chains. *Biochemistry*, 35(37), 12175-12185. doi: 10.1021/bi9530604
- Chao, H. M., Bautista, D. L., Litowski, J., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1998). Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. *Journal of Chromatography B*, 715(1), 307-329. doi: 10.1016/S0378-4347(98)00172-8
- Chapanian, R., & Amsden, B. G. (2010). Combined and sequential delivery of bioactive VEGF165 and HGF from poly(trimethylene carbonate) based photo-cross-linked elastomers. *Journal of Controlled Release*, 143(1), 53-63. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.11.025
- Chen, F. M., Zhang, M., & Wu, Z. F. (2010). Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials*, 31(24), 6279-6308. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.053
- Chen, T. T., Luque, A., Lee, S., Anderson, S. M., Segura, T., & Iruela-Arispe, M. L. (2010). Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *Journal of Cell Biology*, 188(4), 595-609. doi: 10.1083/jcb.200906044
- Chen, Z., Popp, B. V., Bovet, C. L., & Ball, Z. T. (2011). Site-specific protein modification with a dirhodium metallopeptide catalyst. *ACS Chemical Biology*, 6(9), 920-925. doi: 10.1021/cb2001523
- Cheng, A. Y., & Garcia, A. J. (2013). Engineering the matrix microenvironment for cell delivery and engraftment for tissue repair. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(5), 864-871. doi: 10.1016/j.copbio.2013.04.005

- Chiu, L. L., & Radisic, M. (2010). Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues. *Biomaterials*, 31(2), 226-241. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.039
- Chung, J. C., & Shum-Tim, D. (2012). Neovascularization in tissue engineering. *Cells*, 1(4), 1246-1260. doi: 10.3390/cells1041246
- Chung, Y. I., Kim, S. K., Lee, Y. K., Park, S. J., Cho, K. O., Yuk, S. H., . . . Kim, Y. H. (2010). Efficient revascularization by VEGF administration via heparin-functionalized nanoparticle-fibrin complex. *Journal of Controlled Release*, 143(3), 282-289. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.01.010
- Claffey, K. P., Senger, D. R., & Spiegelman, B. M. (1995). Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1246(1), 1-9. doi: 10.1016/0167-4838(94)00144-6
- Cochran, S., Li, C. P., & Ferro, V. (2009). A surface plasmon resonance-based solution affinity assay for heparan sulfate-binding proteins. *Glycoconjugate Journal*, 26(5), 577-587. doi: 10.1007/s10719-008-9210-0
- Conticello, V., Hughes, S., & Modlin, C. (2017). Biomaterials Made from Coiled-Coil Peptides. Dans D. A. D. Parry & J. M. Squire (Édit.), *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms* (p. 575-600). Cham: Springer International Publishing.
- Cormont, M., Meton, I., Mari, M., Monzo, P., Keslair, F., Gaskin, C., . . . Le Marchand-Brustel, Y. (2003). CD2AP/CMS regulates endosome morphology and traffic to the degradative pathway through its interaction with Rab4 and c-Cbl. *Traffic*, 4(2), 97-112. doi: 10.1034/j.1600-0854.2003.40205.x
- Corti, F., & Simons, M. (2017). Modulation of VEGF receptor 2 signaling by protein phosphatases. *Pharmacological Research*, 115 107-123. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.022
- Crafts, T. D., Jensen, A. R., Blocher-Smith, E. C., & Markel, T. A. (2015). Vascular endothelial growth factor: therapeutic possibilities and challenges for the treatment of ischemia. *Cytokine*, 71(2), 385-393. doi: 10.1016/j.cyto.2014.08.005
- Crombez, M., Chevallier, P., Gaudreault, R. C., Petitclerc, E., Mantovani, D., & Laroche, G. (2005). Improving arterial prosthesis neo-endothelialization: application of a proactive

- VEGF construct onto PTFE surfaces. *Biomaterials*, 26(35), 7402-7409. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.051
- Crooks, R. O., Baxter, D., Panek, A. S., Lubben, A. T., & Mason, J. M. (2016). Deriving Heterospecific Self-Assembling Protein-Protein Interactions Using a Computational Interactome Screen. *Journal of Molecular Biology*, 428(2 Pt A), 385-398. doi: 10.1016/j.jmb.2015.11.022
- Culpepper, B. K., Bonvallet, P. P., Reddy, M. S., Ponnazhagan, S., & Bellis, S. L. (2013). Polyglutamate directed coupling of bioactive peptides for the delivery of osteoinductive signals on allograft bone. *Biomaterials*, 34(5), 1506-1513. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.046
- Cunningham, S. A., Tran, T. M., Arrate, M. P., & Brock, T. A. (1999). Characterization of vascular endothelial cell growth factor interactions with the kinase insert domain-containing receptor tyrosine kinase. A real time kinetic study. *Journal of Biological Chemistry*, 274(26), 18421-18427. doi: 10.1074/jbc.274.26.18421
- Dasgupta, A., Mondal, J. H., & Das, D. (2013). Peptide hydrogels. *RSC Advances*, 3(24), 9117-9149. doi: 10.1039/c3ra40234g
- De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry*, 42(6), 1754-1763. doi: 10.1021/bi0268450
- De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. *Journal of Molecular Biology*, 328(5), 1173-1183. doi: 10.1016/s0022-2836(03)00360-7
- de Mel, A., Jell, G., Stevens, M. M., & Seifalian, A. M. (2008). Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review. *Biomacromolecules*, 9(11), 2969-2979. doi: 10.1021/bm800681k

- Del Amo, C., Borau, C., Gutierrez, R., Asin, J., & Garcia-Aznar, J. M. (2016). Quantification of angiogenic sprouting under different growth factors in a microfluidic platform. *Journal of Biomechanics*, 49(8), 1340-1346. doi: 10.1016/j.jbiomech.2015.10.026
- Devine, C., McCollum, C., & North West Femoro-Popliteal Trial, P. (2004). Heparin-bonded Dacron or polytetrafluorethylene for femoropopliteal bypass: five-year results of a prospective randomized multicenter clinical trial. *Journal of Vascular Surgery*, 40(5), 924-931. doi: 10.1016/j.jvs.2004.08.033
- Dixelius, J., Makinen, T., Wirzenius, M., Karkkainen, M. J., Wernstedt, C., Alitalo, K., & Claesson-Welsh, L. (2003). Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 40973-40979. doi: 10.1074/jbc.M304499200
- Dolle, J. P., Rezvan, A., Allen, F. D., Lazarovici, P., & Lelkes, P. I. (2005). Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(3), 1220-1227. doi: 10.1124/jpet.105.093252
- Dong, H., Paramonov, S. E., & Hartgerink, J. D. (2008). Self-assembly of alpha-helical coiled coil nanofibers. *Journal of the American Chemical Society*, 130(41), 13691-13695. doi: 10.1021/ja8037323
- Donten, M. L., Hassan, S., Popp, A., Halter, J., Hauser, K., & Hamm, P. (2015). pH-jump induced leucine zipper folding beyond the diffusion limit. *Journal of Physical Chemistry B*, 119(4), 1425-1432. doi: 10.1021/jp511539c
- Dougherty, D. A. (2013). The cation-pi interaction. *Accounts of Chemical Research*, 46(4), 885-893. doi: 10.1021/ar300265y
- Drogoz, A., David, L., Rochas, C., Domard, A., & Delair, T. (2007). Polyelectrolyte complexes from polysaccharides: formation and stoichiometry monitoring. *Langmuir*, 23(22), 10950-10958. doi: 10.1021/la7008545
- Duran, W. N., Breslin, J. W., & Sanchez, F. A. (2010). The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovascular Research*, 87(2), 254-261. doi: 10.1093/cvr/cvq139

- Durocher, Y., Perret, S., & Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Research*, 30(2), E9. doi: 10.1093/nar/30.2.e9
- École Polytechnique de Montréal. (2017). Le génie biomédical. Tiré de <http://www.polymtl.ca/etudes/bc/information/biomedical.php>
- Edlund, U., Sauter, T., & Albertsson, A. C. (2011). Covalent VEGF protein immobilization on resorbable polymeric surfaces. *Polymers for Advanced Technologies*, 22(1), 166-171. doi: 10.1002/pat.1811
- Eisenberg, D., & McLachlan, A. D. (1986). Solvation energy in protein folding and binding. *Nature*, 319(6050), 199-203. doi: 10.1038/319199a0
- Fearnley, G. W., Smith, G. A., Abdul-Zani, I., Yuldasheva, N., Mughal, N. A., Homer-Vanniasinkam, S., . . . Ponnambalam, S. (2016). VEGF-A isoforms program differential VEGFR2 signal transduction, trafficking and proteolysis. *Biol Open*, 5(5), 571-583. doi: 10.1242/bio.017434
- Feito, M. J., Serrano, M. C., Onaderra, M., Matesanz, M. C., Sanchez-Salcedo, S., Arcos, D., . . . Portoles, M. T. (2016). Effects of immobilized VEGF on endothelial progenitor cells cultured on silicon substituted and nanocrystalline hydroxyapatites. *RSC Advances*, 6(95), 92586-92595. doi: 10.1039/c6ra19154a
- Ferrara, N. (2010). Binding to the extracellular matrix and proteolytic processing: two key mechanisms regulating vascular endothelial growth factor action. *Molecular Biology of the Cell*, 21(5), 687-690. doi: 10.1091/mbc.E09-07-0590
- Ferrara, N., & Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews*, 18(1), 4-25. doi: 10.1210/edrv.18.1.0287
- Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Natural Medicines*, 9(6), 669-676. doi: 10.1038/nm0603-669
- Ferrari, E., Soloviev, M., Niranjana, D., Arsenault, J., Gu, C., Vallis, Y., . . . Davletov, B. (2012). Assembly of protein building blocks using a short synthetic peptide. *Bioconjugate Chemistry*, 23(3), 479-484. doi: 10.1021/bc2005208

- Fiedler, T., Belova, I. V., Murch, G. E., Poologasundarampillai, G., Jones, J. R., Roether, J. A., & Boccaccini, A. R. (2014). A comparative study of oxygen diffusion in tissue engineering scaffolds. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 25(11), 2573-2578. doi: 10.1007/s10856-014-5264-7
- Fletcher, J. M., Boyle, A. L., Bruning, M., Bartlett, G. J., Vincent, T. L., Zaccai, N. R., . . . Woolfson, D. N. (2012). A basis set of de novo coiled-coil peptide oligomers for rational protein design and synthetic biology. *ACS Synth Biol*, 1(6), 240-250. doi: 10.1021/sb300028q
- Fletcher, J. M., Harniman, R. L., Barnes, F. R., Boyle, A. L., Collins, A., Mantell, J., . . . Woolfson, D. N. (2013). Self-assembling cages from coiled-coil peptide modules. *Science*, 340(6132), 595-599. doi: 10.1126/science.1233936
- Folkman, J., & Hochberg, M. (1973). Self-regulation of growth in three dimensions. *Journal of Experimental Medicine*, 138(4), 745-753. doi: 10.1084/jem.138.4.745
- Fortier, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2013). A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery. *Biomaterials*, 34(4), 1344-1353. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.047
- Fortier, C., Louvier, E., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2015). Tailoring the Surface of a Gene Delivery Vector with Carboxymethylated Dextran: A Systematic Analysis. *Biomacromolecules*, 16(6), 1671-1681. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00221
- Freeman, I., & Cohen, S. (2009). The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization. *Biomaterials*, 30(11), 2122-2131. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.057
- Fu, J., Guerette, P. A., & Miserez, A. (2015). Self-Assembly of Recombinant Hagfish Thread Keratins Amenable to a Strain-Induced alpha-Helix to beta-Sheet Transition. *Biomacromolecules*, 16(8), 2327-2339. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00552
- Gaengel, K., & Betsholtz, C. (2013). Endocytosis regulates VEGF signalling during angiogenesis. *Nature Cell Biology*, 15(3), 233-235. doi: 10.1038/ncb2705

- Galas, R. J., Jr., & Liu, J. C. (2014). Surface density of vascular endothelial growth factor modulates endothelial proliferation and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(1), 111-120. doi: 10.1002/jcb.24638
- Gampel, A., Moss, L., Jones, M. C., Brunton, V., Norman, J. C., & Mellor, H. (2006). VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood*, 108(8), 2624-2631. doi: 10.1182/blood-2005-12-007484
- Gerber, H. P., Malik, A. K., Solar, G. P., Sherman, D., Liang, X. H., Meng, G., . . . Ferrara, N. (2002). VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*, 417(6892), 954-958. doi: 10.1038/nature00821
- Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M. H., Keyt, B. A., Dixit, V., & Ferrara, N. (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase Akt signal transduction pathway - Requirement for Flk-1/KDR activation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30336-30343. doi: 10.1074/jbc.273.46.30336
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., . . . Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *Journal of Cell Biology*, 161(6), 1163-1177. doi: 10.1083/jcb.200302047
- Gerling-Driessen, U. I., Mujkic-Ninnemann, N., Ponader, D., Schone, D., Hartmann, L., Kokschi, B., . . . Hartmann, L. (2015). Exploiting Oligo(amido amine) Backbones for the Multivalent Presentation of Coiled-Coil Peptides. *Biomacromolecules*, 16(8), 2394-2402. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00634
- Gianni-Barrera, R., Bartolomeo, M., Vollmar, B., Djonov, V., & Banfi, A. (2014). Split for the cure: VEGF, PDGF-BB and intussusception in therapeutic angiogenesis. *Biochemical Society Transactions*, 42(6), 1637-1642. doi: 10.1042/BST20140234
- Gomes, S., Leonor, I. B., Mano, J. F., Reis, R. L., & Kaplan, D. L. (2012). Natural and Genetically Engineered Proteins for Tissue Engineering. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 1-17. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.07.003

- Gonzalez, L., Jr., Woolfson, D. N., & Alber, T. (1996). Buried polar residues and structural specificity in the GCN4 leucine zipper. *Nature Structural Biology*, 3(12), 1011-1018. doi: 10.1038/nsb1296-1011
- Gradisar, H., Bozic, S., Doles, T., Vengust, D., Hafner-Bratkovic, I., Mertelj, A., . . . Jerala, R. (2013). Design of a single-chain polypeptide tetrahedron assembled from coiled-coil segments. *Nature Chemical Biology*, 9(6), 362-366. doi: 10.1038/nchembio.1248
- Gradisar, H., & Jerala, R. (2011). De novo design of orthogonal peptide pairs forming parallel coiled-coil heterodimers. *Journal of Peptide Science*, 17(2), 100-106. doi: 10.1002/psc.1331
- Guex, A. G., Hegemann, D., Giraud, M. N., Tevaearai, H. T., Popa, A. M., Rossi, R. M., & Fortunato, G. (2014). Covalent immobilisation of VEGF on plasma-coated electrospun scaffolds for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 123, 724-733. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.10.016
- Gunasekar, S. K., Anjia, L., Matsui, H., & Montclare, J. K. (2012). Effects of Divalent Metals on Nanoscopic Fiber Formation and Small Molecule Recognition of Helical Proteins. *Advanced Functional Materials*, 22(10), 2154-2159. doi: 10.1002/adfm.201101627
- Guo, R., Xu, S., Ma, L., Huang, A., & Gao, C. (2010). Enhanced angiogenesis of gene-activated dermal equivalent for treatment of full thickness incisional wounds in a porcine model. *Biomaterials*, 31(28), 7308-7320. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.06.013
- Guo, R., Xu, S., Ma, L., Huang, A., & Gao, C. (2011). The healing of full-thickness burns treated by using plasmid DNA encoding VEGF-165 activated collagen-chitosan dermal equivalents. *Biomaterials*, 32(4), 1019-1031. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.087
- Hagberg, C. E., Falkevall, A., Wang, X., Larsson, E., Huusko, J., Nilsson, I., . . . Eriksson, U. (2010). Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature*, 464(7290), 917-921. doi: 10.1038/nature08945
- Hamed, E., & Ketten, S. (2014). Hierarchical cascades of instability govern the mechanics of coiled coils: helix unfolding precedes coil unzipping. *Biophysical Journal*, 107(2), 477-484. doi: 10.1016/j.bpj.2014.06.009

- Harbury, P. B., Zhang, T., Kim, P. S., & Alber, T. (1993). A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science*, 262(5138), 1401-1407. doi: 10.1126/science.8248779
- Hartmann, M. D. (2017). Functional and Structural Roles of Coiled Coils. Dans D. A. D. Parry & J. M. Squire (Édit.), *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms* (p. 63-93). Cham: Springer International Publishing.
- Herbert, S. P., & Stainier, D. Y. (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(9), 551-564. doi: 10.1038/nrm3176
- Hodges, R. S. (1996). Boehringer Mannheim award lecture 1995. La conference Boehringer Mannheim 1995. De novo design of alpha-helical proteins: basic research to medical applications. *Biochemistry and Cell Biology*, 74(2), 133-154. doi: 10.1139/o96-015
- Hodges, R. S., Mills, J., McReynolds, S., Kirwan, J. P., Tripet, B., & Osguthorpe, D. (2009). Identification of a unique "stability control region" that controls protein stability of tropomyosin: A two-stranded alpha-helical coiled-coil. *Journal of Molecular Biology*, 392(3), 747-762. doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.039
- Hodges, R. S., Saund, A. K., Chong, P. C., St-Pierre, S. A., & Reid, R. E. (1981). Synthetic model for two-stranded alpha-helical coiled-coils. Design, synthesis, and characterization of an 86-residue analog of tropomyosin. *Journal of Biological Chemistry*, 256(3), 1214-1224. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7451500>
- Holmberg, M., Hansen, T. S., Lind, J. U., & Hjorto, G. M. (2012). Increased adsorption of histidine-tagged proteins onto tissue culture polystyrene. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 92(0), 286-292. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.12.001
- Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., & Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 267(36), 26031-26037. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1464614>
- Hu, X., Neoh, K. G., Zhang, J., Kang, E. T., & Wang, W. (2012). Immobilization strategy for optimizing VEGF's concurrent bioactivity towards endothelial cells and osteoblasts on

implant surfaces. *Biomaterials*, 33(32), 8082-8093. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.057

Humphries, J. D., Byron, A., & Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 19), 3901-3903. doi: 10.1242/jcs.03098

Hutchings, H., Ortega, N., & Plouet, J. (2003). Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *FASEB Journal*, 17(11), 1520-1522. doi: 10.1096/fj.02-0691fje

Ichinose, J., Morimatsu, M., Yanagida, T., & Sako, Y. (2006). Covalent immobilization of epidermal growth factor molecules for single-molecule imaging analysis of intracellular signaling. *Biomaterials*, 27(18), 3343-3350. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.047

Ingram, D. A., Mead, L. E., Moore, D. B., Woodard, W., Fenoglio, A., & Yoder, M. C. (2005). Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*, 105(7), 2783-2786. doi: 10.1182/blood-2004-08-3057

Institut canadien d'information sur la santé. (2016). Statistiques relatives aux transplantations, aux listes d'attente et aux donneurs 2015,. Canada: Institut canadien d'information sur la santé. Tiré de <https://www.cihi.ca/sites/default/files/document/corr-estistiques-2015-fr-web.xlsx>

Ito, Y. (2009). Growth Factors on Biomaterial Scaffolds. Dans D. A. B. Puleo, R. (Édit.), *Biological Interactions on Materials Surfaces* (p. 173-197): Springer US.

Ito, Y., Chen, G., & Imanishi, Y. (1998). Micropatterned immobilization of epidermal growth factor to regulate cell function. *Bioconjugate Chemistry*, 9(2), 277-282. doi: 10.1021/bc970190b

Ito, Y., Hasuda, H., Terai, H., & Kitajima, T. (2005). Culture of human umbilical vein endothelial cells on immobilized vascular endothelial growth factor. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 74(4), 659-665. doi: 10.1002/jbm.a.30360

Ito, Y., Zheng, J., Imanishi, Y., Yonezawa, K., & Kasuga, M. (1996). Protein-free cell culture on an artificial substrate with covalently immobilized insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(8), 3598-3601. doi: 10.1073/pnas.93.8.3598

- Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Natural Medicines*, 9(6), 685-693. doi: 10.1038/nm0603-685
- Jing, P., Rudra, J. S., Herr, A. B., & Collier, J. H. (2008). Self-assembling peptide-polymer hydrogels designed from the coiled coil region of fibrin. *Biomacromolecules*, 9(9), 2438-2446. doi: 10.1021/bm800459v
- Joddar, B., & Ito, Y. (2011). Biological modifications of materials surfaces with proteins for regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry*, 21(36), 13737-13755. doi: 10.1039/c1jm10984g
- Johnson, N. R., & Wang, Y. (2013). Controlled delivery of heparin-binding EGF-like growth factor yields fast and comprehensive wound healing. *Journal of Controlled Release*, 166(2), 124-129. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.11.004
- Jouaux, E. M., Timm, B. B., Arndt, K. M., & Exner, T. E. (2009). Improving the interaction of Myc-interfering peptides with Myc using molecular dynamics simulations. *Journal of Peptide Science*, 15(1), 5-15. doi: 10.1002/psc.1078
- Kamiya, T. (1997). A procedure for the detection of free thiol-containing proteins on a polyvinylidene difluoride membrane. *Journal of Immunoassay*, 18(1), 111-123. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9139046>
- Kaplan, J. B., Reinke, A. W., & Keating, A. E. (2014). Increasing the affinity of selective bZIP-binding peptides through surface residue redesign. *Protein Science*, 23(7), 940-953. doi: 10.1002/pro.2477
- Kawahara, D., & Matsuda, T. (2012). Hydrodynamic shear-stress-dependent retention of endothelial and endothelial progenitor cells adhered to vascular endothelial growth factor-fixed surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 100(5), 1218-1228. doi: 10.1002/jbm.b.32686
- Kawamura, H., Li, X., Goishi, K., van Meeteren, L. A., Jakobsson, L., Cebe-Suarez, S., . . . Claesson-Welsh, L. (2008). Neuropilin-1 in regulation of VEGF-induced activation of p38MAPK and endothelial cell organization. *Blood*, 112(9), 3638-3649. doi: 10.1182/blood-2007-12-125856

- Kelm, J. M., Lorber, V., Snedeker, J. G., Schmidt, D., Broggini-Tenzer, A., Weisstanner, M., . . . Hoerstrup, S. P. (2010). A novel concept for scaffold-free vessel tissue engineering: self-assembly of microtissue building blocks. *Journal of Biotechnology*, 148(1), 46-55. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.03.002
- Kendall, R. L., & Thomas, K. A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(22), 10705-10709. doi: 10.1073/pnas.90.22.10705
- Keyt, B. A., Berleau, L. T., Nguyen, H. V., Chen, H., Heinsohn, H., Vandlen, R., & Ferrara, N. (1996). The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *Journal of Biological Chemistry*, 271(13), 7788-7795. doi: 10.1074/jbc.271.13.7788
- Keyt, B. A., Nguyen, H. V., Berleau, L. T., Duarte, C. M., Park, J., Chen, H., & Ferrara, N. (1996). Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 271(10), 5638-5646. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621427>
- Khademhosseini, A., & Langer, R. (2016). A decade of progress in tissue engineering. *Nature Protocols*, 11(10), 1775-1781. doi: 10.1038/nprot.2016.123
- Kobayashi, S., Sawano, A., Nojima, Y., Shibuya, M., & Maru, Y. (2004). The c-Cbl/CD2AP complex regulates VEGF-induced endocytosis and degradation of Flt-1 (VEGFR-1). *FASEB Journal*, 18(7), 929-931. doi: 10.1096/fj.03-0767fje
- Kocar, V., Bozic Abram, S., Doles, T., Basic, N., Gradisar, H., Pisanski, T., & Jerala, R. (2015). TOPOFOLD, the designed modular biomolecular folds: polypeptide-based molecular origami nanostructures following the footsteps of DNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 7(2), 218-237. doi: 10.1002/wnan.1289
- Koch, S., & Claesson-Welsh, L. (2012). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(7), a006502. doi: 10.1101/cshperspect.a006502

- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., & Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochemical Journal*, 437(2), 169-183. doi: 10.1042/BJ20110301
- Koch, S., van Meeteren, L. A., Morin, E., Testini, C., Westrom, S., Bjorkelund, H., . . . Claesson-Welsh, L. (2014). NRP1 presented in trans to the endothelium arrests VEGFR2 endocytosis, preventing angiogenic signaling and tumor initiation. *Developmental Cell*, 28(6), 633-646. doi: 10.1016/j.devcel.2014.02.010
- Kofler, N. M., Shawber, C. J., Kangsamaksin, T., Reed, H. O., Galatioto, J., & Kitajewski, J. (2011). Notch signaling in developmental and tumor angiogenesis. *Genes Cancer*, 2(12), 1106-1116. doi: 10.1177/1947601911423030
- Kojima, S., Kuriki, Y., Yoshida, T., Yazaki, K., & Miura, K. (1997). Fibril formation by an amphipathic alpha-helix-forming polypeptide produced by gene engineering. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences*, 73(1), 7-11. doi: 10.2183/pjab.73.7
- Kolb, H. C., & Sharpless, K. B. (2003). The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today*, 8(24), 1128-1137. doi: 10.1016/S1359-6446(03)02933-7
- Konagaya, S., Kato, K., Nakaji-Hirabayashi, T., & Iwata, H. (2011). Design of culture substrates for large-scale expansion of neural stem cells. *Biomaterials*, 32(4), 992-1001. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.008
- Koobatian, M. T., Row, S., Smith, R. J., Jr., Koenigsknecht, C., Andreadis, S. T., & Swartz, D. D. (2016). Successful endothelialization and remodeling of a cell-free small-diameter arterial graft in a large animal model. *Biomaterials*, 76 344-358. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.020
- Korn, C., & Augustin, H. G. (2015). Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. *Developmental Cell*, 34(1), 5-17. doi: 10.1016/j.devcel.2015.06.004
- Krilleke, D., DeErkenez, A., Schubert, W., Giri, I., Robinson, G. S., Ng, Y. S., & Shima, D. T. (2007). Molecular mapping and functional characterization of the VEGF164 heparin-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 28045-28056. doi: 10.1074/jbc.M700319200

- Kuhl, P. R., & Griffith-Cima, L. G. (1996). Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor-induced stimulation from the solid phase. *Natural Medicines*, 2(9), 1022-1027. doi: 10.1038/nm0996-1022
- Kumada, Y., Shiritani, Y., Hamasaki, K., Ohse, T., & Kishimoto, M. (2009). High biological activity of a recombinant protein immobilized onto polystyrene. *Biotechnology Journal*, 4(8), 1178-1189. doi: 10.1002/biot.200800192
- Kumeria, T., Gulati, K., Santos, A., & Losic, D. (2013). Real-time and in situ drug release monitoring from nanoporous implants under dynamic flow conditions by reflectometric interference spectroscopy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(12), 5436-5442. doi: 10.1021/am4013984
- Lahtinen, M., Blomberg, P., Baliulis, G., Carlsson, F., Khamis, H., & Zemgulis, V. (2007). In vivo h-VEGF165 gene transfer improves early endothelialisation and patency in synthetic vascular grafts. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 31(3), 383-390. doi: 10.1016/j.ejcts.2006.11.048
- Lake, A. C., Vassy, R., Di Benedetto, M., Lavigne, D., Le Visage, C., Perret, G. Y., & Letourneur, D. (2006). Low molecular weight fucoidan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37844-37852. doi: 10.1074/jbc.M600686200
- Lampugnani, M. G., Orsenigo, F., Gagliani, M. C., Tacchetti, C., & Dejana, E. (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *Journal of Cell Biology*, 174(4), 593-604. doi: 10.1083/jcb.200602080
- Lanahan, A. A., Hermans, K., Claes, F., Kerley-Hamilton, J. S., Zhuang, Z. W., Giordano, F. J., . . . Simons, M. (2010). VEGF receptor 2 endocytic trafficking regulates arterial morphogenesis. *Developmental Cell*, 18(5), 713-724. doi: 10.1016/j.devcel.2010.02.016
- Laschke, M. W., & Menger, M. D. (2012). Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation. *European Surgical Research*, 48(2), 85-92. doi: 10.1159/000336876
- Lauer, G., Sollberg, S., Cole, M., Krieg, T., & Eming, S. A. (2002). Generation of a novel proteolysis resistant vascular endothelial growth factor165variant by a site-directed

- mutation at the plasmin sensitive cleavage site. *FEBS Letters*, 531(2), 309-313. doi: 10.1016/s0014-5793(02)03545-7
- Lazarous, D. F., Shou, M., Scheinowitz, M., Hodge, E., Thirumurti, V., Kitsiou, A. N., . . . Unger, E. F. (1996). Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation*, 94(5), 1074-1082. doi: 10.1161/01.cir.94.5.1074
- Lee, R. J., Springer, M. L., Blanco-Bose, W. E., Shaw, R., Ursell, P. C., & Blau, H. M. (2000). VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation*, 102(8), 898-901. doi: 10.1161/01.cir.102.8.898
- Lee, S., Chen, T. T., Barber, C. L., Jordan, M. C., Murdock, J., Desai, S., . . . Iruela-Arispe, M. L. (2007). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*, 130(4), 691-703. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.054
- Lee, S., Jilani, S. M., Nikolova, G. V., Carpizo, D., & Iruela-Arispe, M. L. (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *Journal of Cell Biology*, 169(4), 681-691. doi: 10.1083/jcb.200409115
- Lequoy, P., Liberelle, B., De Crescenzo, G., & Lerouge, S. (2014). Additive benefits of chondroitin sulfate and oriented tethered epidermal growth factor for vascular smooth muscle cell survival. *Macromolecular Bioscience*, 14(5), 720-730. doi: 10.1002/mabi.201300443
- Lequoy, P., Murschel, F., Liberelle, B., Lerouge, S., & De Crescenzo, G. (2016). Controlled co-immobilization of EGF and VEGF to optimize vascular cell survival. *Acta Biomaterialia*, 29 239-247. doi: 10.1016/j.actbio.2015.10.026
- Liberelle, B., Bartholin, L., Boucher, C., Murschel, F., Jolicœur, M., Durocher, Y., . . . De Crescenzo, G. (2010). New ELISA approach based on coiled-coil interactions. *Journal of Immunological Methods*, 362(1-2), 161-167. doi: 10.1016/j.jim.2010.09.027
- Lindhorst, D., Tavassol, F., von See, C., Schumann, P., Laschke, M. W., Harder, Y., . . . Rucker, M. (2010). Effects of VEGF loading on scaffold-confined vascularization. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 95(3), 783-792. doi: 10.1002/jbm.a.32902

- Litowski, J. R., & Hodges, R. S. (2001). Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils: the effect of chain length on protein folding, stability and specificity. *Journal of Peptide Research*, 58(6), 477-492. doi: 10.1034/j.1399-3011.2001.10972.x
- Litowski, J. R., & Hodges, R. S. (2002). Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils. Effects of hydrophobicity and alpha-helical propensity on protein folding, stability, and specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37272-37279. doi: 10.1074/jbc.M204257200
- Liu, I. J., Kao, C. L., Hsieh, S. C., Wey, M. T., Kan, L. S., & Wang, W. K. (2009). Identification of a minimal peptide derived from heptad repeat (HR) 2 of spike protein of SARS-CoV and combination of HR1-derived peptides as fusion inhibitors. *Antiviral Research*, 81(1), 82-87. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.10.001
- Liu, L., Ratner, B. D., Sage, E. H., & Jiang, S. (2007). Endothelial cell migration on surface-density gradients of fibronectin, VEGF, or both proteins. *Langmuir*, 23(22), 11168-11173. doi: 10.1021/la701435x
- Liu, X., Fan, K., & Wang, W. (2004). The number of protein folds and their distribution over families in nature. *Proteins*, 54(3), 491-499. doi: 10.1002/prot.10514
- Liu, Y., Zhang, J., Wang, J., Wang, Y., Zeng, Z., Liu, T., . . . Huang, N. (2015). Tailoring of the dopamine coated surface with VEGF loaded heparin/poly-L-lysine particles for anticoagulation and accelerate in situ endothelialization. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 103(6), 2024-2034. doi: 10.1002/jbm.a.35339
- Lode, A., Wolf-Brandstetter, C., Reinstorf, A., Bernhardt, A., Konig, U., Pompe, W., & Gelinsky, M. (2007). Calcium phosphate bone cements, functionalized with VEGF: release kinetics and biological activity. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 81(2), 474-483. doi: 10.1002/jbm.a.31024
- Lupas, A. N., & Gruber, M. (2005). The structure of alpha-helical coiled coils. *Advances in Protein Chemistry*, 70 37-78. doi: 10.1016/S0065-3233(05)70003-6
- Malan, D., Wenzel, D., Schmidt, A., Geisen, C., Raible, A., Bolck, B., . . . Bloch, W. (2010). Endothelial beta1 integrins regulate sprouting and network formation during vascular development. *Development*, 137(6), 993-1002. doi: 10.1242/dev.045377

- Martino, M. M., Brkic, S., Bovo, E., Burger, M., Schaefer, D. J., Wolff, T., . . . Banfi, A. (2015). Extracellular matrix and growth factor engineering for controlled angiogenesis in regenerative medicine. *Front Bioeng Biotechnol*, 3 45. doi: 10.3389/fbioe.2015.00045
- Masaki, I., Yonemitsu, Y., Yamashita, A., Sata, S., Tanii, M., Komori, K., . . . Sueishi, K. (2002). Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circulation Research*, 90(9), 966-973. doi: 10.1161/01.res.0000019540.41697.60
- Mason, J. M., & Arndt, K. M. (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *ChemBioChem*, 5(2), 170-176. doi: 10.1002/cbic.200300781
- Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, 3(11), e442. doi: 10.1371/journal.pmed.0030442
- McColl, B. K., Stacker, S. A., & Achen, M. G. (2004). Molecular regulation of the VEGF family -- inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *APMIS*, 112(7-8), 463-480. doi: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0807.x
- Melchiorri, A. J., Hibino, N., & Fisher, J. P. (2013). Strategies and techniques to enhance the in situ endothelialization of small-diameter biodegradable polymeric vascular grafts. *Tissue Eng Part B Rev*, 19(4), 292-307. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0577
- Melchiorri, A. J., Hibino, N., Yi, T., Lee, Y. U., Sugiura, T., Tara, S., . . . Fisher, J. P. (2015). Contrasting biofunctionalization strategies for the enhanced endothelialization of biodegradable vascular grafts. *Biomacromolecules*, 16(2), 437-446. doi: 10.1021/bm501853s
- Melero-Martin, J. M., Khan, Z. A., Picard, A., Wu, X., Paruchuri, S., & Bischoff, J. (2007). In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood*, 109(11), 4761-4768. doi: 10.1182/blood-2006-12-062471
- Mentzer, S. J., & Konerding, M. A. (2014). Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis*, 17(3), 499-509. doi: 10.1007/s10456-014-9428-3
- Metrick, M. A., & MacDonald, G. (2015). Hofmeister ion effects on the solvation and thermal stability of model proteins lysozyme and myoglobin. *Colloids and Surfaces A:*

Physicochemical and Engineering Aspects, 469(0), 242-251. doi: 10.1016/j.colsurfa.2015.01.038

Michaels, A. D., & Chatterjee, K. (2002). Cardiology patient pages. Angioplasty versus bypass surgery for coronary artery disease. *Circulation*, 106(23), e187-190. doi: 10.1161/01.cir.0000044747.37349.64

Midy, V., Hollande, E., Rey, C., Dard, M., & Plouet, J. (2001). Adsorption of vascular endothelial growth factor to two different apatitic materials and its release. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 12(4), 293-298. doi: 10.1023/A:1011286818733

Millauer, B., Witzigmannvoos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N. P. H., Risau, W., & Ullrich, A. (1993). High-Affinity Vegf Binding and Developmental Expression Suggest Flk-1 as a Major Regulator of Vasculogenesis and Angiogenesis. *Cell*, 72(6), 835-846. doi: 10.1016/0092-8674(93)90573-9

Mineur, P., Colige, A. C., Deroanne, C. F., Dubail, J., Kesteloot, F., Habraken, Y., . . . Lambert, C. A. (2007). Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *Journal of Cell Biology*, 179(6), 1261-1273. doi: 10.1083/jcb.200703052

Miyagi, Y., Chiu, L. L., Cimini, M., Weisel, R. D., Radisic, M., & Li, R. K. (2011). Biodegradable collagen patch with covalently immobilized VEGF for myocardial repair. *Biomaterials*, 32(5), 1280-1290. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.007

Mohan, T., Niegellhell, K., Zarth, C. S., Kargl, R., Kostler, S., Ribitsch, V., . . . Stana-Kleinschek, K. (2014). Triggering protein adsorption on tailored cationic cellulose surfaces. *Biomacromolecules*, 15(11), 3931-3941. doi: 10.1021/bm500997s

Moll, J. R., Ruvinov, S. B., Pastan, I., & Vinson, C. (2001). Designed heterodimerizing leucine zippers with a ranger of pIs and stabilities up to 10⁽⁻¹⁵⁾ M. *Protein Science*, 10(3), 649-655. doi: 10.1110/ps.39401

Monera, O. D., Sereda, T. J., Zhou, N. E., Kay, C. M., & Hodges, R. S. (1995). Relationship of sidechain hydrophobicity and alpha-helical propensity on the stability of the single-stranded amphipathic alpha-helix. *Journal of Peptide Science*, 1(5), 319-329. doi: 10.1002/psc.310010507

- Moran, L. B., Schneider, J. P., Kentsis, A., Reddy, G. A., & Sosnick, T. R. (1999). Transition state heterogeneity in GCN4 coiled coil folding studied by using multisite mutations and crosslinking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), 10699-10704. doi: 10.1073/pnas.96.19.10699
- Moss, A. J., Sharma, S., & Brindle, N. P. (2009). Rational design and protein engineering of growth factors for regenerative medicine and tissue engineering. *Biochemical Society Transactions*, 37(Pt 4), 717-721. doi: 10.1042/BST0370717
- Muller, Y. A., Li, B., Christinger, H. W., Wells, J. A., Cunningham, B. C., & de Vos, A. M. (1997). Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), 7192-7197. doi: 10.1073/pnas.94.14.7192
- Murschel, F., Liberelle, B., St-Laurent, G., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2013). Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor. *Acta Biomaterialia*, 9(6), 6806-6813. doi: 10.1016/j.actbio.2013.02.032
- Murschel, F., Zaimi, A., Noel, S., Jolicoeur, M., & De Crescenzo, G. (2015). Specific Adsorption via Peptide Tags: Oriented Grafting and Release of Growth Factors for Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 16(11), 3445-3454. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00955
- Myoken, Y., Kayada, Y., Okamoto, T., Kan, M., Sato, G. H., & Sato, J. D. (1991). Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) produced by A-431 human epidermoid carcinoma cells and identification of VEGF membrane binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(13), 5819-5823. doi: 10.1073/pnas.88.13.5819
- Nakaji-Hirabayashi, T., Kato, K., Arima, Y., & Iwata, H. (2007). Oriented immobilization of epidermal growth factor onto culture substrates for the selective expansion of neural stem cells. *Biomaterials*, 28(24), 3517-3529. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.04.022
- Nakayama, M., Nakayama, A., van Lessen, M., Yamamoto, H., Hoffmann, S., Drexler, H. C., . . . Adams, R. H. (2013). Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. *Nature Cell Biology*, 15(3), 249-260. doi: 10.1038/ncb2679

- Neufeld, G., & Kessler, O. (2008). The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 8(8), 632-645. doi: 10.1038/nrc2404
- Noel, S. (2015). *Développement de revêtements polymériques bioactifs pour prothèses vasculaires synthétiques*. (École Polytechnique de Montréal, Montréal, QC). Tiré de <http://publications.polymtl.ca/1844/>
- Noel, S., Fortier, C., Murschel, F., Belzil, A., Gaudet, G., Jolicoeur, M., & De Crescenzo, G. (2016). Co-immobilization of adhesive peptides and VEGF within a dextran-based coating for vascular applications. *Acta Biomaterialia*, 37 69-82. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.043
- Noel, S., Hachem, A., Merhi, Y., & De Crescenzo, G. (2015). Development of a Polyester Coating Combining Antithrombogenic and Cell Adhesive Properties: Influence of Sequence and Surface Density of Adhesion Peptides. *Biomacromolecules*, 16(6), 1682-1694. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00219
- Noel, S., Liberelle, B., Robitaille, L., & De Crescenzo, G. (2011). Quantification of primary amine groups available for subsequent biofunctionalization of polymer surfaces. *Bioconjugate Chemistry*, 22(8), 1690-1699. doi: 10.1021/bc200259c
- Noel, S., Liberelle, B., Yogi, A., Moreno, M. J., Bureau, M. N., Robitaille, L., & De Crescenzo, G. (2013). A non-damaging chemical amination protocol for poly(ethylene terephthalate) - application to the design of functionalized compliant vascular grafts. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(2), 230-238. doi: 10.1039/c2tb00082b
- O'Shea, E. K., Klemm, J. D., Kim, P. S., & Alber, T. (1991). X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science*, 254(5031), 539-544. doi: 10.1126/science.1948029
- O'Shea, E. K., Lumb, K. J., & Kim, P. S. (1993). Peptide 'Velcro': design of a heterodimeric coiled coil. *Current Biology*, 3(10), 658-667. doi: 10.1016/0960-9822(93)90063-T
- Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(5), 359-371. doi: 10.1038/nrm1911
- Organisation mondiale de la Santé. (2016). Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015. Geneva, Switzerland: Organisation mondiale

de la Santé. Tiré de

http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html

- Ozawa, C. R., Banfi, A., Glazer, N. L., Thurston, G., Springer, M. L., Kraft, P. E., . . . Blau, H. M. (2004). Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 113(4), 516-527. doi: 10.1172/JCI18420
- Pan, Q., Chathery, Y., Wu, Y., Rathore, N., Tong, R. K., Peale, F., . . . Watts, R. J. (2007). Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24049-24056. doi: 10.1074/jbc.M703554200
- Pandya, M. J., Spooner, G. M., Sunde, M., Thorpe, J. R., Rodger, A., & Woolfson, D. N. (2000). Sticky-end assembly of a designed peptide fiber provides insight into protein fibrillogenesis. *Biochemistry*, 39(30), 8728-8734. doi: 10.1021/bi000246g
- Pardo, A. M. P., Bryhan, M., Krasnow, H., Hardin, N., Riddle, M., LaChance, O., . . . Hoover, D. S. (2005). Corning CellBIND Surface: An Improved Surface for Enhanced Cell Attachment. Technical Report. Corning Incorporated Life Sciences, Acton (MA): Tiré de http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/Media/pdf/t_CellBIND_Improved_Surface_CLS_AN_057.pdf
- Park, J. E., Keller, G. A., & Ferrara, N. (1993). Vascular endothelial growth-factor (VEGF) isoforms - Differential deposition into the subepithelial extracellular-matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular Biology of the Cell*, 4(12), 1317-1326. doi: 10.1091/mbc.4.12.1317
- Parry, D. A., Fraser, R. D., & Squire, J. M. (2008). Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure. *Journal of Structural Biology*, 163(3), 258-269. doi: 10.1016/j.jsb.2008.01.016
- Patterson, D. P., Su, M., Franzmann, T. M., Sciore, A., Skiniotis, G., & Marsh, E. N. (2014). Characterization of a highly flexible self-assembling protein system designed to form nanocages. *Protein Science*, 23(2), 190-199. doi: 10.1002/pro.2405
- Paul, A., Shao, W., Shum-Tim, D., & Prakash, S. (2012). The attenuation of restenosis following arterial gene transfer using carbon nanotube coated stent incorporating

- TAT/DNA(Ang1+Vegf) nanoparticles. *Biomaterials*, 33(30), 7655-7664. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.06.096
- Pechar, M., Pola, R., Laga, R., Braunova, A., Filippov, S. K., Bogomolova, A., . . . Ulbrich, K. (2014). Coiled coil peptides and polymer-peptide conjugates: synthesis, self-assembly, characterization and potential in drug delivery systems. *Biomacromolecules*, 15(7), 2590-2599. doi: 10.1021/bm500436p
- Pechar, M., Pola, R., Laga, R., Ulbrich, K., Bednarova, L., Malon, P., . . . Vanek, O. (2011). Coiled coil peptides as universal linkers for the attachment of recombinant proteins to polymer therapeutics. *Biomacromolecules*, 12(10), 3645-3655. doi: 10.1021/bm200897b
- Pepper, M. S. (2001). Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 21(7), 1104-1117. doi: 10.1161/hq0701.093685
- Phelps, E. A., & Garcia, A. J. (2009). Update on therapeutic vascularization strategies. *Regenerative Medicine*, 4(1), 65-80. doi: 10.2217/17460751.4.1.65
- Place, E. S., Evans, N. D., & Stevens, M. M. (2009). Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature Materials*, 8(6), 457-470. doi: 10.1038/nmat2441
- Place, L. W., Sekyi, M., & Kipper, M. J. (2014). Aggrecan-mimetic, glycosaminoglycan-containing nanoparticles for growth factor stabilization and delivery. *Biomacromolecules*, 15(2), 680-689. doi: 10.1021/bm401736c
- Poh, C. K., Shi, Z., Lim, T. Y., Neoh, K. G., & Wang, W. (2010). The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells in vitro. *Biomaterials*, 31(7), 1578-1585. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.042
- Porter, A. M., Klinge, C. M., & Gobin, A. S. (2010). Biomimetic Hydrogels with VEGF Induce Angiogenic Processes in Both hUVEC and hMEC. *Biomacromolecules*, 12(1), 242-246. doi: 10.1021/bm101220b
- Porter, A. M., Klinge, C. M., & Gobin, A. S. (2011). Biomimetic hydrogels with VEGF induce angiogenic processes in both hUVEC and hMEC. *Biomacromolecules*, 12(1), 242-246. doi: 10.1021/bm101220b

- Potgens, A. J. G., Lubsen, N. H., Vanaltena, M. C., Vermeulen, R., Bakker, A., Schoenmakers, J. G. G., . . . Dewaal, R. M. W. (1994). Covalent Dimerization of Vascular-Permeability Factor Vascular Endothelial Growth-Factor Is Essential for Its Biological-Activity - Evidence from Cys to Ser Mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 32879-32885. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7806514>
- Prahst, C., Heroult, M., Lanahan, A. A., Uziel, N., Kessler, O., Shraga-Heled, N., . . . Augustin, H. G. (2008). Neuropilin-1-VEGFR-2 complexing requires the PDZ-binding domain of neuropilin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), 25110-25114. doi: 10.1074/jbc.C800137200
- Prakash Parthiban, S., Rana, D., Jabbari, E., Benkirane-Jessel, N., & Ramalingam, M. (2017). Covalently immobilized VEGF-mimicking peptide with gelatin methacrylate enhances microvascularization of endothelial cells. *Acta Biomaterialia*, 51 330-340. doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.046
- Prinz, H. (2010). Hill coefficients, dose-response curves and allosteric mechanisms. *Journal of Chemical Biology*, 3(1), 37-44. doi: 10.1007/s12154-009-0029-3
- Quinlan, R. A., Bromley, E. H., & Pohl, E. (2015). A silk purse from a sow's ear-bioinspired materials based on alpha-helical coiled coils. *Current Opinion in Cell Biology*, 32 131-137. doi: 10.1016/j.ceb.2014.12.010
- Quinn, T. P., Peters, K. G., Devries, C., Ferrara, N., & Williams, L. T. (1993). Fetal Liver Kinase-1 Is a Receptor for Vascular Endothelial Growth-Factor and Is Selectively Expressed in Vascular Endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(16), 7533-7537. doi: 10.1073/pnas.90.16.7533
- Rabe, M., Schwieger, C., Zope, H. R., Versluis, F., & Kros, A. (2014). Membrane interactions of fusogenic coiled-coil peptides: implications for lipopeptide mediated vesicle fusion. *Langmuir*, 30(26), 7724-7735. doi: 10.1021/la500987c
- Rahimi, N. (2012). The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(3), 538-548. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0555

- Raikwar, N. S., Liu, K. Z., & Thomas, C. P. (2016). Ectodomain cleavage of FLT1 regulates receptor activation and function and is not required for its downstream intracellular cleavage. *Experimental Cell Research*, 344(1), 103-111. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.03.020
- Raman, S., Machaidze, G., Lustig, A., Aebi, U., & Burkhard, P. (2006). Structure-based design of peptides that self-assemble into regular polyhedral nanoparticles. *Nanomedicine*, 2(2), 95-102. doi: 10.1016/j.nano.2006.04.007
- Ramcharitar, S., & Serruys, P. W. (2008). Fully biodegradable coronary stents. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 8(5), 305-314. doi: 10.2165/00129784-200808050-00003
- Randone, B., Cavallaro, G., Polistena, A., Cucina, A., Coluccia, P., Graziano, P., & Cavallaro, A. (2005). Dual role of VEGF in pretreated experimental ePTFE arterial grafts. *Journal of Surgical Research*, 127(2), 70-79. doi: 10.1016/j.jss.2004.09.005
- Rao, S. V., Anderson, K. W., & Bachas, L. G. (1998). Oriented immobilization of proteins. *Mikrochimica Acta*, 128(3-4), 127-143. doi: 10.1007/Bf01243043
- Reed, S., & Wu, B. (2014). Sustained growth factor delivery in tissue engineering applications. *Annals of Biomedical Engineering*, 42(7), 1528-1536. doi: 10.1007/s10439-013-0956-6
- Reihill, J. A., Ewart, M. A., & Salt, I. P. (2011). The role of AMP-activated protein kinase in the functional effects of vascular endothelial growth factor-A and -B in human aortic endothelial cells. *Vasc Cell*, 3 9. doi: 10.1186/2045-824X-3-9
- Reinke, A. W., Grant, R. A., & Keating, A. E. (2010). A synthetic coiled-coil interactome provides heterospecific modules for molecular engineering. *Journal of the American Chemical Society*, 132(17), 6025-6031. doi: 10.1021/ja907617a
- Riahi, N., Cappadocia, L., Henry, O., Omichinski, J., & De Crescenzo, G. (2016). Soluble expression, purification and functional characterization of a coil peptide composed of a positively charged and hydrophobic motif. *Amino Acids*, 48(2), 567-577. doi: 10.1007/s00726-015-2113-z
- Rich, R. L., & Myszka, D. G. (2000). Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(1), 54-61. doi: 10.1016/S0958-1669(99)00054-3

- Richardson, T. P., Peters, M. C., Ennett, A. B., & Mooney, D. J. (2001). Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nature Biotechnology*, 19(11), 1029-1034. doi: 10.1038/nbt1101-1029
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), 671-674. doi: 10.1038/386671a0
- Robson Marsden, H., & Kros, A. (2010). Self-assembly of coiled coils in synthetic biology: inspiration and progress. *Angewandte Chemie. International Edition in English*, 49(17), 2988-3005. doi: 10.1002/anie.200904943
- Rose, A., & Meier, I. (2004). Scaffolds, levers, rods and springs: diverse cellular functions of long coiled-coil proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(16), 1996-2009. doi: 10.1007/s00018-004-4039-6
- Roth, D., Piekarek, M., Paulsson, M., Christ, H., Bloch, W., Krieg, T., . . . Eming, S. A. (2006). Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. *American Journal of Pathology*, 168(2), 670-684. doi: 10.2353/ajpath.2006.050372
- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., Fujisawa, H., . . . Shima, D. T. (2002). Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes & Development*, 16(20), 2684-2698. doi: 10.1101/gad.242002
- Ryadnov, M. G., Ceyhan, B., Niemeyer, C. M., & Woolfson, D. N. (2003). "Belt and braces": a peptide-based linker system of de novo design. *Journal of the American Chemical Society*, 125(31), 9388-9394. doi: 10.1021/ja0352045
- Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N., & Shibuya, M. (2005). Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4), 1076-1081. doi: 10.1073/pnas.0404984102
- Salimath, A. S., Phelps, E. A., Boopathy, A. V., Che, P. L., Brown, M., Garcia, A. J., & Davis, M. E. (2012). Dual delivery of hepatocyte and vascular endothelial growth factors via a

- protease-degradable hydrogel improves cardiac function in rats. *PLoS One*, 7(11), e50980. doi: 10.1371/journal.pone.0050980
- Samorezov, J. E., & Alsberg, E. (2015). Spatial regulation of controlled bioactive factor delivery for bone tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 84(0), 45-67. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.018
- Sasaki, M., Inoue, M., Katada, Y., & Taguchi, T. (2012). The effect of VEGF-immobilized nickel-free high-nitrogen stainless steel on viability and proliferation of vascular endothelial cells. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 92 1-8. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.10.061
- Sawamiphak, S., Seidel, S., Essmann, C. L., Wilkinson, G. A., Pitulescu, M. E., Acker, T., & Acker-Palmer, A. (2010). Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature*, 465(7297), 487-491. doi: 10.1038/nature08995
- Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S., Aonuma, M., & Shibuya, M. (1996). Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth & Differentiation*, 7(2), 213-221. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8822205>
- Schliephake, H., Strecker, N., Forster, A., Schwenzer, B., Reichert, J., & Scharnweber, D. (2012). Angiogenic functionalisation of titanium surfaces using nano-anchored VEGF - an in vitro study. *European Cells and Materials*, 23 161-169; discussion 169. doi: 10.22203/eCM.v023a12
- Schuck, P., & Zhao, H. (2010). The role of mass transport limitation and surface heterogeneity in the biophysical characterization of macromolecular binding processes by SPR biosensing. *Methods in Molecular Biology*, 627 15-54. doi: 10.1007/978-1-60761-670-2_2
- Seifu, D. G., Purnama, A., Mequanint, K., & Mantovani, D. (2013). Small-diameter vascular tissue engineering. *Nature Reviews. Cardiology*, 10(7), 410-421. doi: 10.1038/nrcardio.2013.77
- Sharma, V. A., Logan, J., King, D. S., White, R., & Alber, T. (1998). Sequence-based design of a peptide probe for the APC tumor suppressor protein. *Current Biology*, 8(14), 823-830. doi: 10.1016/S0960-9822(98)70324-0

- Sharon, J. L., & Puleo, D. A. (2008). Immobilization of glycoproteins, such as VEGF, on biodegradable substrates. *Acta Biomaterialia*, 4(4), 1016-1023. doi: 10.1016/j.actbio.2008.02.017
- Shen, B. Q., Lee, D. Y., Gerber, H. P., Keyt, B. A., Ferrara, N., & Zioncheck, T. F. (1998). Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 29979-29985. doi: 10.1074/jbc.273.45.29979
- Shen, Y. H., Shoichet, M. S., & Radisic, M. (2008). Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 477-489. doi: 10.1016/j.actbio.2007.12.011
- Shin, Y. M., Lee, Y. B., Kim, S. J., Kang, J. K., Park, J. C., Jang, W., & Shin, H. (2012). Mussel-inspired immobilization of vascular endothelial growth factor (VEGF) for enhanced endothelialization of vascular grafts. *Biomacromolecules*, 13(7), 2020-2028. doi: 10.1021/bm300194b
- Shinkai, A., Ito, M., Anazawa, H., Yamaguchi, S., Shitara, K., & Shibuya, M. (1998). Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31283-31288. doi: 10.1074/jbc.273.47.31283
- Simons, M. (2012). An inside view: VEGF receptor trafficking and signaling. *Physiology (Bethesda)*, 27(4), 213-222. doi: 10.1152/physiol.00016.2012
- Simons, M., Gordon, E., & Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(10), 611-625. doi: 10.1038/nrm.2016.87
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., & Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92(6), 735-745. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81402-6
- Sorkin, A., & von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(9), 609-622. doi: 10.1038/nrm2748

- Srinivasan, N., & Kumar, S. (2012). Ordered and disordered proteins as nanomaterial building blocks. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 4(2), 204-218. doi: 10.1002/wnan.1160
- Staton, C. A., Reed, M. W., & Brown, N. J. (2009). A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(3), 195-221. doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00633.x
- Stone, G. W., Moses, J. W., Ellis, S. G., Schofer, J., Dawkins, K. D., Morice, M., . . . Leon, M. B. (2007). Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *New England Journal of Medicine*, 356(10), 998-1008. doi: 10.1056/NEJMoa067193
- Su, J. Y., Hodges, R. S., & Kay, C. M. (1994). Effect of chain length on the formation and stability of synthetic alpha-helical coiled coils. *Biochemistry*, 33(51), 15501-15510. doi: 10.1021/bi00255a032
- Swanson, N., Hogrefe, K., Javed, Q., & Gershlick, A. H. (2003). In vitro evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF)-eluting stents. *International Journal of Cardiology*, 92(2-3), 247-251. doi: 10.1016/S0167-5273(03)00102-5
- Swanson, N., Hogrefe, K., Javed, Q., Malik, N., & Gershlick, A. H. (2003). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-eluting stents: in vivo effects on thrombosis, endothelialization and intimal hyperplasia. *Journal of Invasive Cardiology*, 15(12), 688-692. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14660819>
- Tada, S., Kitajima, T., & Ito, Y. (2012). Design and synthesis of binding growth factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), 6053-6072. doi: 10.3390/ijms13056053
- Taguchi, T., Kishida, A., Akashi, M., & Maruyama, I. (2000). Immobilization of human vascular endothelial growth factor (VEGF165) onto biomaterials: An evaluation of the biological activity of immobilized VEGF165. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 15(4), 309-320. doi: 10.1106/U857-Bgyg-Up8g-C6t3
- Takashima, S., Kitakaze, M., Asakura, M., Asanuma, H., Sanada, S., Tashiro, F., . . . Hori, M. (2002). Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3657-3662. doi: 10.1073/pnas.022017899
- Tang, C., Wang, G., Wu, X., Li, Z., Shen, Y., Lee, J. C., & Yu, Q. (2011). The impact of vascular endothelial growth factor-transfected human endothelial cells on endothelialization and restenosis of stainless steel stents. *Journal of Vascular Surgery*, 53(2), 461-471. doi: 10.1016/j.jvs.2010.08.020
- Terman, B. I., Doughervermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D., & Bohlen, P. (1992). Identification of the Kdr Tyrosine Kinase as a Receptor for Vascular Endothelial-Cell Growth-Factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 187(3), 1579-1586. doi: 10.1016/0006-291x(92)90483-2
- Thomas, F., Boyle, A. L., Burton, A. J., & Woolfson, D. N. (2013). A set of de novo designed parallel heterodimeric coiled coils with quantified dissociation constants in the micromolar to sub-nanomolar regime. *Journal of the American Chemical Society*, 135(13), 5161-5166. doi: 10.1021/ja312310g
- Thompson, K. E., Bashor, C. J., Lim, W. A., & Keating, A. E. (2012). SYNZIP protein interaction toolbox: in vitro and in vivo specifications of heterospecific coiled-coil interaction domains. *ACS Synth Biol*, 1(4), 118-129. doi: 10.1021/sb200015u
- Tiraferri, A., & Elimelech, M. (2012). Direct quantification of negatively charged functional groups on membrane surfaces. *Journal of Membrane Science*, 389(0), 499-508. doi: 10.1016/j.memsci.2011.11.018
- Traub, S., Morgner, J., Martino, M. M., Honing, S., Swartz, M. A., Wickstrom, S. A., . . . Eming, S. A. (2013). The promotion of endothelial cell attachment and spreading using FNIII10 fused to VEGF-A165. *Biomaterials*, 34(24), 5958-5968. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.050
- Tripet, B., Wagschal, K., Lavigne, P., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (2000). Effects of side-chain characteristics on stability and oligomerization state of a de novo-designed model coiled-coil: 20 amino acid substitutions in position "d". *Journal of Molecular Biology*, 300(2), 377-402. doi: 10.1006/jmbi.2000.3866

- Tripet, B., Yu, L., Bautista, D. L., Wong, W. Y., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1996). Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain off the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. *Protein Engineering*, 9(11), 1029-1042. doi: 10.1093/protein/9.11.1029
- Tropsha, A., Bowen, J. P., Brown, F. K., & Kizer, J. S. (1991). Do interhelical side chain-backbone hydrogen bonds participate in formation of leucine zipper coiled coils? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(21), 9488-9492. doi: 10.1073/pnas.88.21.9488
- Urbich, C., Dernbach, E., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2002). Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circulation Research*, 90(6), 737-744. doi: 10.1161/01.RES.0000014081.30867.F8
- Vajanto, I., Rissanen, T. T., Rutanen, J., Hiltunen, M. O., Tuomisto, T. T., Arve, K., . . . Yla-Herttuala, S. (2002). Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and LacZ. *Journal of Gene Medicine*, 4(4), 371-380. doi: 10.1002/jgm.287
- Van Belle, E., Maillard, L., Tio, F. O., & Isner, J. M. (1997). Accelerated endothelialization by local delivery of recombinant human vascular endothelial growth factor reduces in-stent intimal formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235(2), 311-316. doi: 10.1006/bbrc.1997.6772
- Van Belle, E., Tio, F. O., Couffinhal, T., Maillard, L., Passeri, J., & Isner, J. M. (1997). Stent endothelialization. Time course, impact of local catheter delivery, feasibility of recombinant protein administration, and response to cytokine expedition. *Circulation*, 95(2), 438-448. doi: 10.1161/01.CIR.95.2.438
- van Lith, R., & Ameer, G. A. (2011). Biohybrid Strategies for Vascular Grafts. Dans N. Pallua & C. V. Suscheck (Édit.), *Tissue Engineering: From Lab to Clinic* (p. 279-316). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Vempati, P., Popel, A. S., & Mac Gabhann, F. (2014). Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(1), 1-19. doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.11.002

- Vogler, E. A. (2012). Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials*, 33(5), 1201-1237. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.059
- von Tiedemann, B., & Bilitewski, U. (2002). Characterization of the vascular endothelial growth factor-receptor interaction and determination of the recombinant protein by an optical receptor sensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 17(11-12), 983-991. doi: 10.1016/S0956-5663(02)00090-8
- Wagschal, K., Tripet, B., Lavigne, P., Mant, C., & Hodges, R. S. (1999). The role of position a in determining the stability and oligomerization state of alpha-helical coiled coils: 20 amino acid stability coefficients in the hydrophobic core of proteins. *Protein Science*, 8(11), 2312-2329. doi: 10.1110/ps.8.11.2312
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., & Heldin, C. H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 269(43), 26988-26995. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929439>
- Wang, A. Y., Leong, S., Liang, Y. C., Huang, R. C., Chen, C. S., & Yu, S. M. (2008). Immobilization of growth factors on collagen scaffolds mediated by polyanionic collagen mimetic peptides and its effect on endothelial cell morphogenesis. *Biomacromolecules*, 9(10), 2929-2936. doi: 10.1021/bm800727z
- Wang, H. G., Yin, T. Y., Ge, S. P., Zhang, Q., Dong, Q. L., Lei, D. X., . . . Wang, G. X. (2013). Biofunctionalization of titanium surface with multilayer films modified by heparin-VEGF-fibronectin complex to improve endothelial cell proliferation and blood compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 101(2), 413-420. doi: 10.1002/jbm.a.34339
- Wang, Q., Gao, Y., Sun, X., Ji, B., Cui, X., Liu, Y., . . . Quan, D. (2014). Acceleration of aneurysm healing by P(DLLA-co-TMC)-coated coils enabling the controlled release of vascular endothelial growth factor. *Biomed Mater*, 9(4), 045004. doi: 10.1088/1748-6041/9/4/045004

- Wang, T., Lau, W. L., DeGrado, W. F., & Gai, F. (2005). T-jump infrared study of the folding mechanism of coiled-coil GCN4-p1. *Biophysical Journal*, 89(6), 4180-4187. doi: 10.1529/biophysj.105.068809
- Wang, Y., Fei, D., Vanderlaan, M., & Song, A. (2004). Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody *in vitro*. *Angiogenesis*, 7(4), 335-345. doi: 10.1007/s10456-004-8272-2
- Wells, A., Welsh, J. B., Lazar, C. S., Wiley, H. S., Gill, G. N., & Rosenfeld, M. G. (1990). Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor. *Science*, 247(4945), 962-964. doi: 10.1126/science.2305263
- Woolard, J., Wang, W. Y., Bevan, H. S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R. O., . . . Bates, D. O. (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, *in vivo* effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Research*, 64(21), 7822-7835. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0934
- Woolfson, D. N. (2005). The Design of Coiled-Coil Structures and Assemblies. Dans *Advances in Protein Chemistry* (vol. Volume 70, p. 79-112): Academic Press.
- Woolfson, D. N. (2017). Coiled-Coil Design: Updated and Upgraded. Dans D. A. D. Parry & J. M. Squire (Édit.), *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms* (p. 35-61). Cham: Springer International Publishing.
- Wu, P., Fu, Y., & Cai, K. (2014). Regulation of the migration of endothelial cells by a gradient density of vascular endothelial growth factor. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 123 181-190. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.09.013
- Wu, X. F., Yin, Z. Z., Cao, C. P., Huang, L., Lu, X. M., Liu, J. X., & Cui, W. Z. (2004). Expression of human VEGF165 in silkworm (*Bombyx mori* L.) by using a recombinant baculovirus and its bioactivity assay. *Journal of Biotechnology*, 111(3), 253-261. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.04.016
- Xi, Z., Gao, Y., Sirinakis, G., Guo, H., & Zhang, Y. (2012). Single-molecule observation of helix staggering, sliding, and coiled coil misfolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5711-5716. doi: 10.1073/pnas.1116784109

- Xiong, K. Q., Qi, P. K., Yang, Y., Li, X. Y., Qiu, H., Li, X., . . . Huang, N. (2016). Facile immobilization of vascular endothelial growth factor on a tannic acid-functionalized plasma-polymerized allylamine coating rich in quinone groups. *RSC Advances*, 6(21), 17188-17195. doi: 10.1039/c5ra25917g
- Xu, C., Liu, R., Mehta, A. K., Guerrero-Ferreira, R. C., Wright, E. R., Dunin-Horkawicz, S., . . . Conticello, V. P. (2013). Rational design of helical nanotubes from self-assembly of coiled-coil lock washers. *Journal of the American Chemical Society*, 135(41), 15565-15578. doi: 10.1021/ja4074529
- Yang, Z., Tu, Q., Wang, J., & Huang, N. (2012). The role of heparin binding surfaces in the direction of endothelial and smooth muscle cell fate and re-endothelialization. *Biomaterials*, 33(28), 6615-6625. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.06.055
- Yu, M., Du, F., Ise, H., Zhao, W., Zhang, Y., Yu, Y., . . . Akaike, T. (2012). Preparation and characterization of a VEGF-Fc fusion protein matrix for enhancing HUVEC growth. *Biotechnology Letters*, 34(9), 1765-1771. doi: 10.1007/s10529-012-0959-7
- Yu, Y., Chen, J., Chen, R., Cao, L., Tang, W., Lin, D., . . . Liu, C. (2015). Enhancement of VEGF-Mediated Angiogenesis by 2-N,6-O-Sulfated Chitosan-Coated Hierarchical PLGA Scaffolds. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(18), 9982-9990. doi: 10.1021/acsami.5b02324
- Zhang, H., Jia, X., Han, F., Zhao, J., Zhao, Y., Fan, Y., & Yuan, X. (2013). Dual-delivery of VEGF and PDGF by double-layered electrospun membranes for blood vessel regeneration. *Biomaterials*, 34(9), 2202-2212. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.005
- Zhang, J., Ding, L., Zhao, Y., Sun, W., Chen, B., Lin, H., . . . Dai, J. (2009). Collagen-targeting vascular endothelial growth factor improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation*, 119(13), 1776-1784. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.800565
- Zhang, X., Shi, X., Li, J., Hu, Z., Zhou, D., Gao, J., & Tan, W. (2012). A novel therapeutic vaccine of mouse GM-CSF surface modified MB49 cells against metastatic bladder cancer. *Journal of Urology*, 187(3), 1071-1079. doi: 10.1016/j.juro.2011.10.126

- Zhao, W., McCallum, S. A., Xiao, Z., Zhang, F., & Linhardt, R. J. (2012). Binding affinities of vascular endothelial growth factor (VEGF) for heparin-derived oligosaccharides. *Bioscience Reports*, 32(1), 71-81. doi: 10.1042/BSR20110077
- Zhou, J., Ding, J., Nie, B., Hu, S., Zhu, Z., Chen, J., . . . Dong, N. (2016). Promotion of adhesion and proliferation of endothelial progenitor cells on decellularized valves by covalent incorporation of RGD peptide and VEGF. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 27(9), 142. doi: 10.1007/s10856-016-5750-1
- Zhou, M., Liu, Z., Wei, Z., Liu, C., Qiao, T., Ran, F., . . . Ding, Y. (2009). Development and validation of small-diameter vascular tissue from a decellularized scaffold coated with heparin and vascular endothelial growth factor. *Artificial Organs*, 33(3), 230-239. doi: 10.1111/j.1525-1594.2009.00713.x
- Zhou, N. E., Kay, C. M., & Hodges, R. S. (1992). Synthetic model proteins: the relative contribution of leucine residues at the nonequivalent positions of the 3-4 hydrophobic repeat to the stability of the two-stranded alpha-helical coiled-coil. *Biochemistry*, 31(25), 5739-5746. doi: 10.1021/bi00140a008
- Zhou, N. E., Kay, C. M., & Hodges, R. S. (1994). The role of interhelical ionic interactions in controlling protein folding and stability. De novo designed synthetic two-stranded alpha-helical coiled-coils. *Journal of Molecular Biology*, 237(4), 500-512. doi: 10.1006/jmbi.1994.1250
- Zieris, A., Prokoph, S., Levental, K. R., Welzel, P. B., Grimmer, M., Freudenberg, U., & Werner, C. (2010). FGF-2 and VEGF functionalization of starPEG-heparin hydrogels to modulate biomolecular and physical cues of angiogenesis. *Biomaterials*, 31(31), 7985-7994. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.021
- Zisch, A. H., Lutolf, M. P., Ehrbar, M., Raeber, G. P., Rizzi, S. C., Davies, N., . . . Hubbell, J. A. (2003). Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB Journal*, 17(15), 2260-2262. doi: 10.1096/fj.02-1041fje

ANNEXE A – DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 5

Cette annexe est dédiée aux données complémentaires à l'article intitulé *Two complementary approaches for the controlled release of biomolecules immobilized via coiled-coil interactions: Peptide core mutations and multivalent presentation*, dont le corps est présenté dans le Chapitre 5.

A.1 Header

SUPPORTING INFORMATION FOR:

TWO COMPLEMENTARY APPROACHES FOR THE CONTROLLED RELEASE OF BIOMOLECULES IMMOBILIZED VIA COILED-COIL INTERACTIONS: PEPTIDE CORE MUTATIONS AND MULTIVALENT PRESENTATION

Frederic Murschel[‡], Charles Fortier[‡], Mario Jolicoeur[‡], Robert S. Hodges[§], Gregory De Crescenzo^{‡,}*

A.2 Author affiliations

[‡]Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB), Bio-P2 Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal, QC, Canada H3C 3A7.

[§]Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Colorado, School of Medicine, Anschutz Medical Campus, Aurora, CO 80045, USA

*Corresponding author. E-mail address: gregory.decrescenzo@polymtl.ca (#7428); Fax: (514) 340-2990

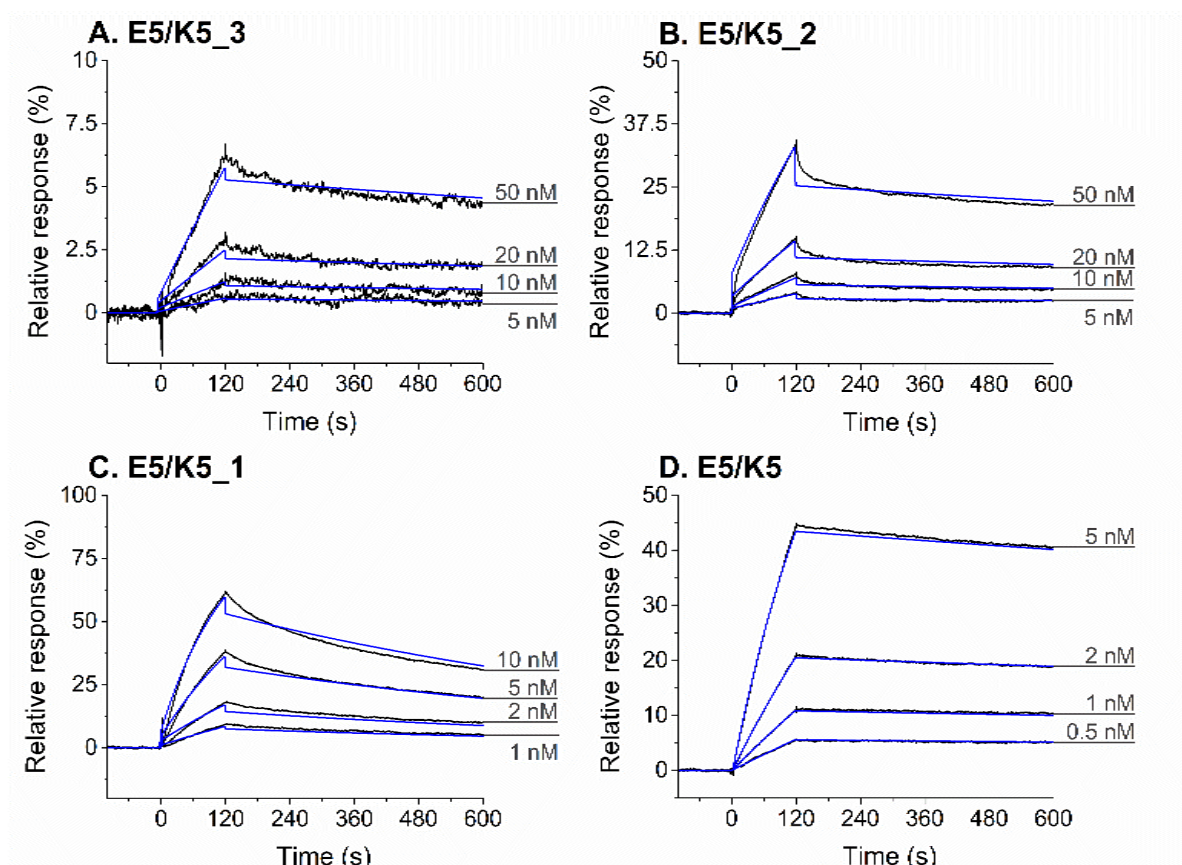


Figure annexe -1 : Global analysis of the E5 interaction with the K peptides.

Different concentrations of E5 were injected over ca. 600 RUs of (A) K5_3, (B) K5_2, (C) K5_1 and (D) K5. Black: double-referenced experimental data. Blue: global fits related to the simple binding model. The data are shown relative to the maximal response (R/Rmax).

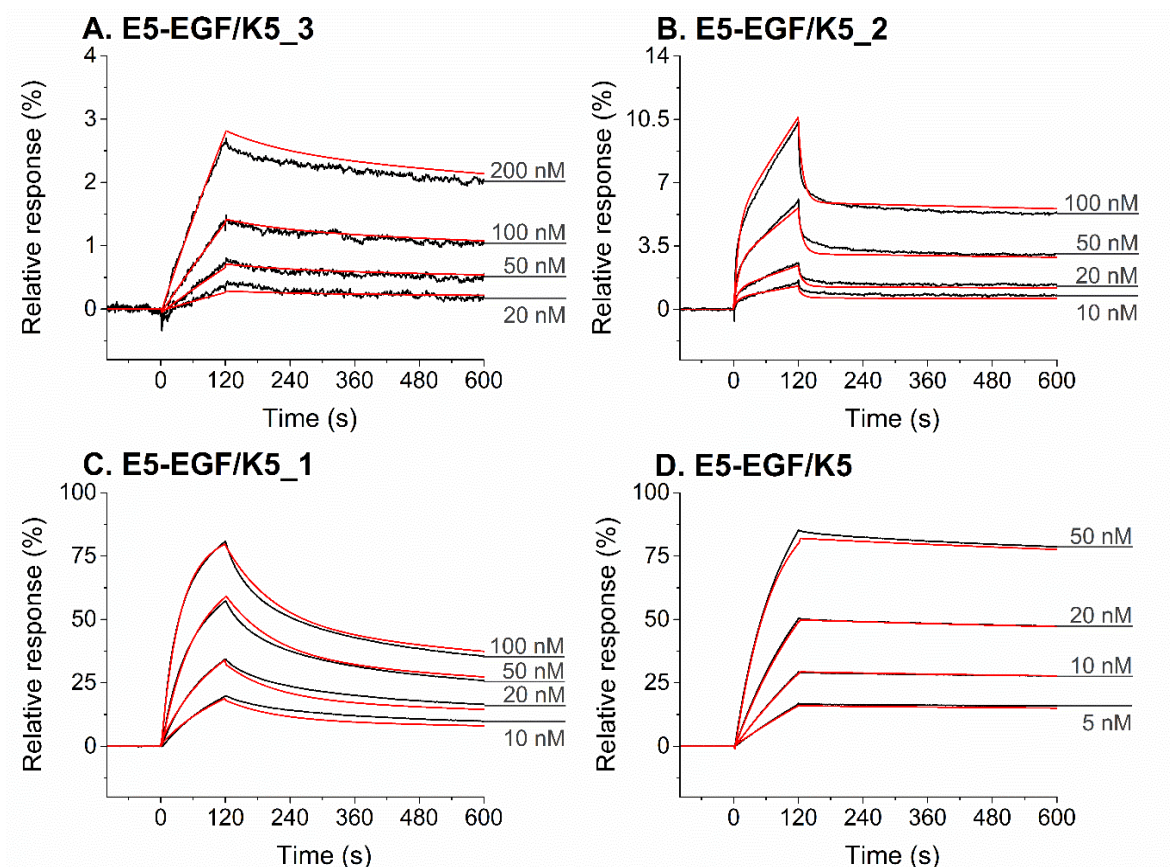


Figure annex-2 : Global analysis of the E5-tagged EGF interaction with the K peptides.

Different concentrations of E5-EGF were injected over ca. 600 RUs of (A) K5_3, (B) K5_2, (C) K5_1 and (D) K5. Black: double-referenced experimental data. Red: global fits related to the conformational change (3-state) model. The data are shown relative to the maximal response (R/R_{max}).

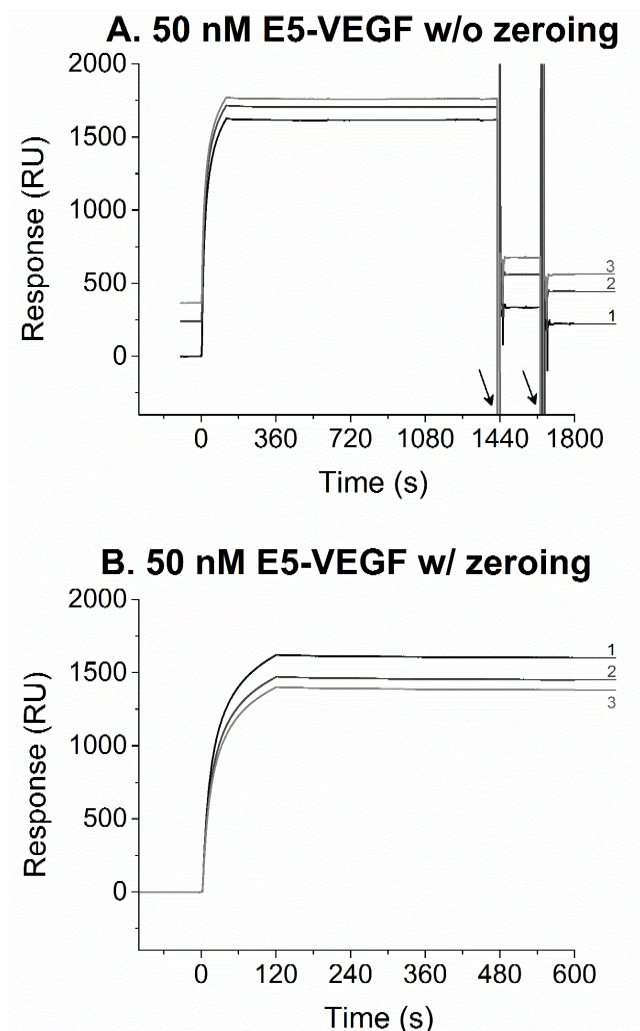


Figure annexe -3 : Interaction of E5-tagged VEGF with the K5 peptide.

Three 50-nM injections of E5-VEGF were performed over ca. 600 RUs of K5: '1' in black, '2' in dark gray and '3' in light gray, in that order. The data are shown after double referencing, (A) without or (B) with setting the baseline to zero at the start of injection. Regeneration attempts are depicted with arrows.

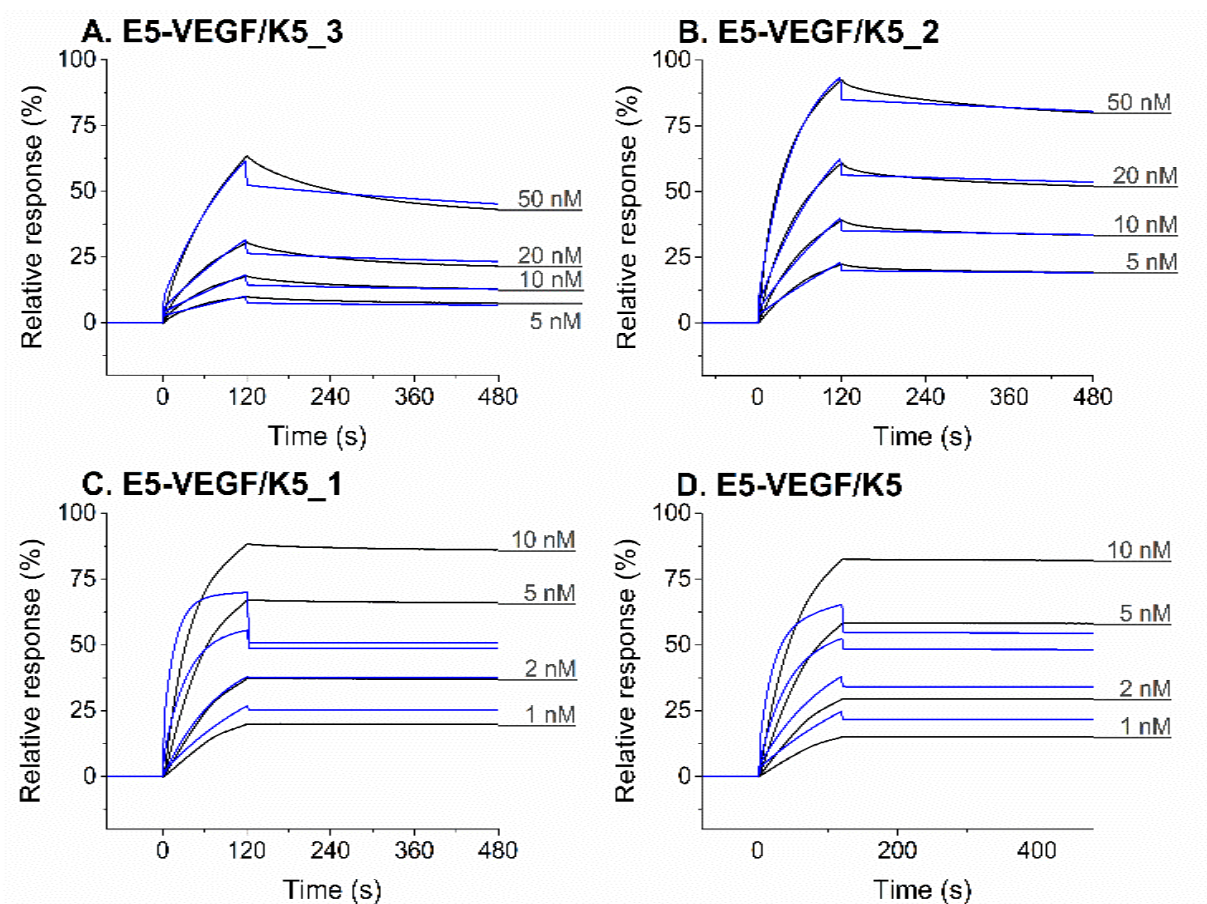


Figure annexe -4 : Global analysis of E5-tagged VEGF interaction with the K peptides.

Different concentrations of E5-VEGF were injected over ca. 600 RUs of (A) K5_3, (B) K5_2, (C) K5_1 and (D) K5. Black: double-referenced experimental data. Blue: global fits related to the bivalent interaction model. The data are shown relative to the maximal response (R/R_{max}).

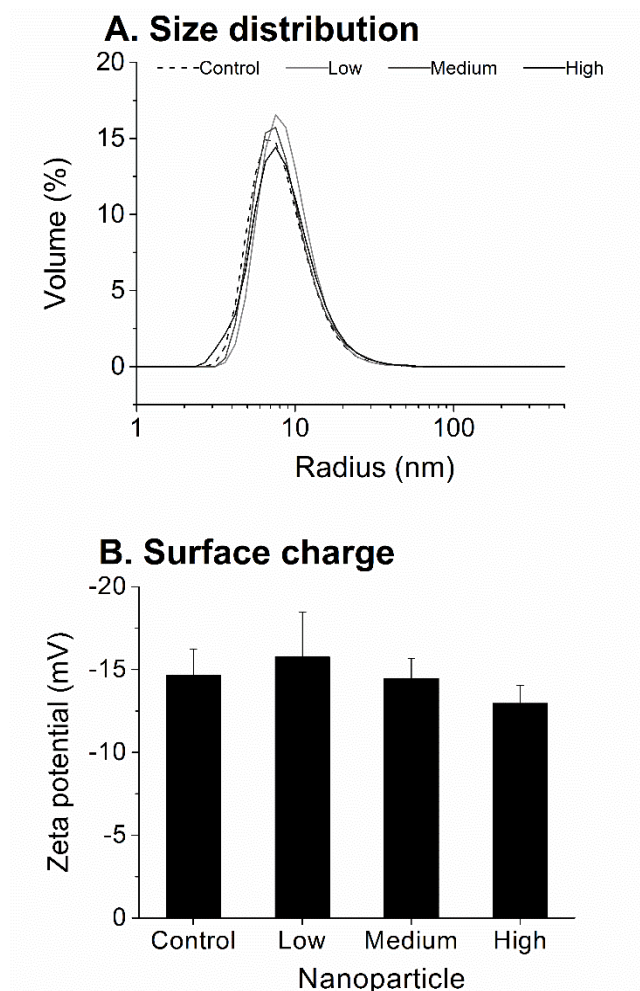


Figure annexe -5 : DLS measurements of CMD/PEI polyelectrolyte complexes (PECs) bearing varying E5 surface densities (Low, Medium and High).

The hydrodynamic diameter (size distribution by volume, **A**) and zeta potential (surface charge, **B**) were measured in complexation buffer, and PECs with no E5 moieties were used as control.

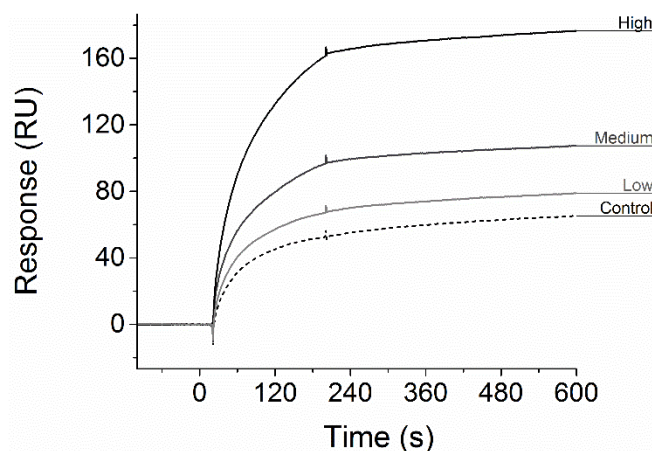


Figure annexe -6 : Interaction of E5-decorated nanoparticles with the K5 peptide.

A set of nanoparticles with varying E5 surface densities was injected over K5 peptides at 5 $\mu\text{g/mL}$ of PEI. The data are shown after double referencing, and PECs with no E5 moieties were used as control.

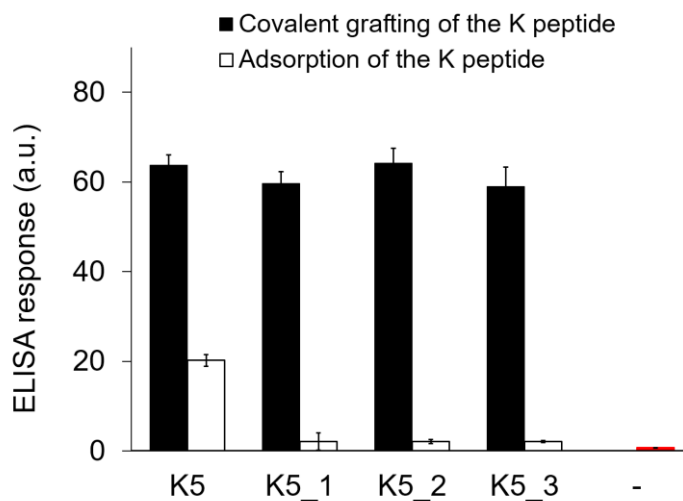


Figure annexe -7 : Capture of E5-VEGF on well plates decorated with the K peptides.

First, K peptides were incubated on surfaces bearing reactive dextran-VS moieties (black bars) or surfaces blocked beforehand with 2-mercaptoethanol (white bars). E5-VEGF was then injected at various concentrations on each surface (50, 50, 200 and 3000 pM for K5, K5_1, K5_2 and K5_3, respectively). The amount of captured E5-VEGF was then assessed by a direct ELISA. E5-VEGF at 3000 pM on a surface with no K peptide was used as control (red bar).

ANNEXE B – DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 6

Cette annexe est dédiée aux données complémentaires à l'article intitulé *Specific adsorption via peptide tags: Oriented grafting and release of growth factors for tissue engineering*, dont le corps est présenté dans le Chapitre 6. Ces données sont accessibles [en ligne](#).

B.1 Header

SUPPORTING INFORMATION FOR: SPECIFIC ADSORPTION VIA PEPTIDE TAGS: ORIENTED GRAFTING AND RELEASE OF GROWTH FACTORS FOR TISSUE ENGINEERING

Frederic Murschel,[†] Aldo Zaimi,[‡] Samantha Noel,[†] Mario Jolicoeur,[†] and Gregory De Crescenzo^{,†,‡}*

B.2 Author affiliations

[†]Department of Chemical Engineering and [‡]Institute of Biomedical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB), Bio-P2 Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal, QC, Canada H3C 3A7

*Corresponding author. E-mail address: gregory.decrescenzo@polymtl.ca.

B.3 XPS analysis of PS-based microplates

XPS measurements were performed on a VG ESCALAB 3 MkII instrument using non-monochromatic Mg K α radiation (12 kV, 18 mA). The samples were extensively washed and immersed in an ultrasonic bath prior to cutting (4 mm x 4 mm) from a 48-well microplate, in order to remove any possible trace of chemical residues that could alter XPS measurements. A compositional survey and high-resolution scans were acquired at 0° emission angle, normal to the surface, using an analyzer pass energy of 100 eV and 20 eV, respectively. XPS data analysis was performed by applying a Shirley-type background subtraction, using sensitivity factors from the

Wagner table and charging correction by referencing to the C 1s peak at 285.0 eV (Beamson & Briggs, 1993).

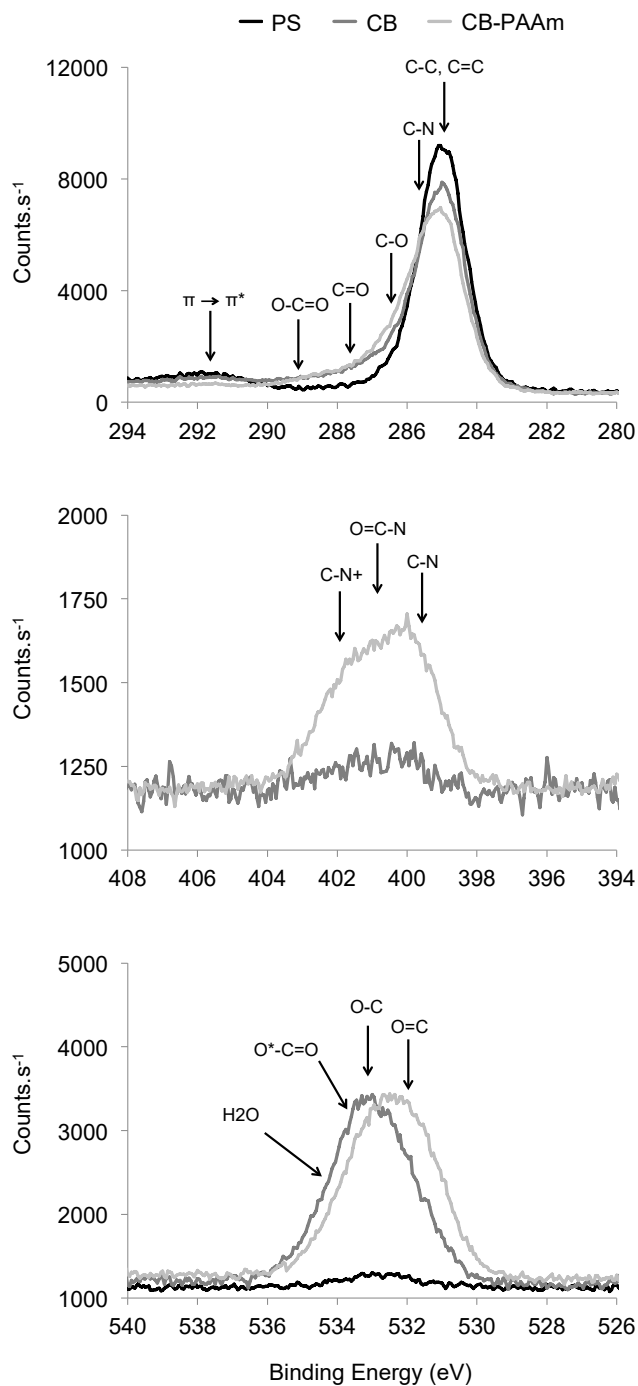


Figure annexe -8 : XPS spectra obtained from high-resolution scans of polystyrene (PS), CellBIND (CB), and CellBIND-PAAm (CB-PAAm) well-plates.

Table annexe -1 : Atomic percentages derived from XPS analysis of samples from PS, CB and CB-PAAm well-plates.

	binding energy (eV)	identification	plate		
			PS	CB	CB-PAAm
C 1s peak (at. %)	285.0	C 1s	98.6	82.5	78.8
	285.0	C-C, C=C	89.7	69.3	56.5
	285.7	C-N	•	•	5.7
	286.5	C-O	1.7	7.5	10.4
	287.8	C=O	•	2.8	4.3
	289.1	O-C=O	•	0.9	1.3
	291.7	“Shake-up” ^a	7.2	2.0	0.6
N 1s peak (at. %)	400.2	N 1s	•	1.6	5.5
	399.5	NH ₂	•	•	2.3
	400.7	O-C=N	•	1.0	1.7
	402.0	NH ₃ ⁺	•	0.6	1.5
O 1s peak (at. %)	532.8	O 1s	1.4	16.0	15.7
	532.0	C=O	•	5.0	5.6
	533.0	C-O	1.4	8.3	8.8
	533.7	O*-C=O	•	1.0	1.3
	534.2	H ₂ O	•	1.7	•

^aThe “shake-up” peak is caused by electronic excitation of the π -electron system on a benzene ring ($\pi \rightarrow \pi^*$). *Atom of interest in the peak. • Not detected.

XPS data showed that the plasma-treated CB surfaces featured high oxygen content (16 at. %) and, more specifically, carboxyl (O*-C=O), carbonyl (C=O) and hydroxyl (C-O) groups (**Table annexe -1**), in good agreement with the manufacturer’s guide (Pardo et al., 2005). The high-resolution survey also indicated that the density of polystyrene phenyl groups was strongly diminished by the CB treatment although a significant proportion remained detectable (O 1s peak, 7.2 and 2.0 at. % on pristine PS and CB, respectively). The low amino content (N 1s peak, 1.6 at. %) was attributed to unidentified contaminants. We further modified the CB surface by incubating a poly(allylamine) (PAAm) solution supplemented with NHS and EDC (see 6.8.1). Formation of a covalent bond between activated carboxyl groups on the surface and primary amino groups of the polymer was confirmed by the increase in amide content on CB-PAAm (O-C=N peak, 1.7 at. %). Accordingly, the density of primary amino groups increased on the latter (NH₂ and NH₃⁺ peaks, total 3.8 at. %).

B.4 Adsorption of E5-VEGF onto aminated poly(ethylene terephthalate) films

PET-PAAm films were incubated with various concentrations of VEGF or E5-VEGF and protein density was assessed by ELISA (**Figure annexe -9**). The tagged chimera showed considerably higher levels of adsorption on PET-PAAm when compared to pristine PET, or to untagged VEGF incubated on PET-PAAm, in good agreement with the results obtained on CB-PAAm (**Figure 6-2**).

B.5 Endothelial cell survival triggered by adsorbed E5-VEGF

Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were seeded on CB-PAAm previously decorated with E5-VEGF at concentrations ranging from 0.5 to 100 nM. The cells were allowed to adhere for 3 h, then further cultivated for 48 h in serum-free basal medium, that is, in pro-apoptotic conditions (Murschel et al., 2013). The adhesion levels were unaffected by the protein density (data not shown). After 48 h, the normalized response of HUVECs increased with the amount of E5-VEGF used for surface preparation (**Figure annexe -10**), following a sigmoid-like trend very similar to the results obtained in proliferation assays (**Figure 6-2**) and in good agreement with the results we previously obtained on aminated glass with E5-VEGF grafted via coiled-coil interactions (Murschel et al., 2013).

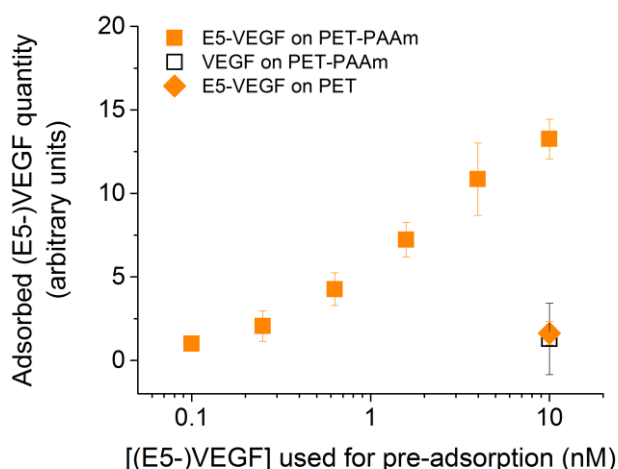


Figure annexe -9 : Presence of a coil-tag enables E5-VEGF adsorption on PET-PAAm films.

ELISA response obtained with native and E5-tagged VEGF incubated over pristine and aminated PET films.

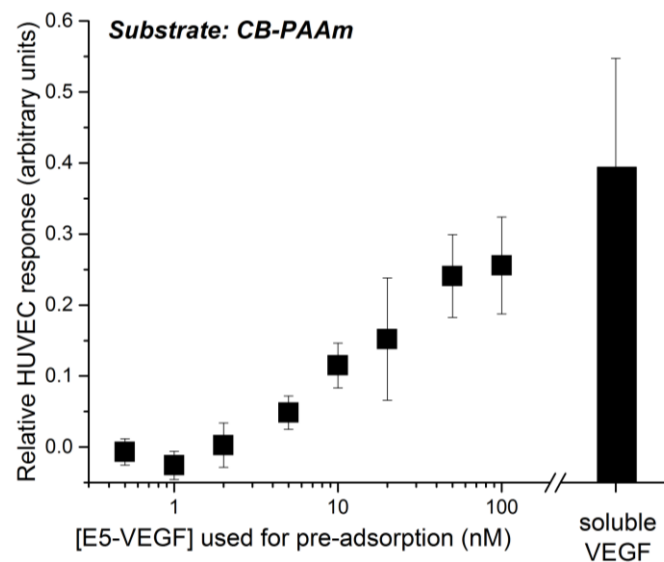


Figure annexe -10 : E5-VEGF adsorbed on CB-PAAm retains bioactivity.

HUVEC survival in 96-well plates decorated with various densities of E5-VEGF in basal medium, evaluated by resazurin assays after 48 h. Data are represented as assay response relative to the response obtained with cells in complete medium and in basal medium.